

学位申請論文

ヒト VASH1/SVBP 複合体の構造解析

2021 年 3 月

指導教員 医学博士 西野達哉

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

池田 聡人

目次

目次.....	1
要旨.....	2
略語一覧.....	3
第1章 序論.....	4
第2章 材料と方法.....	6
DNA クローニングとタンパク質調製.....	6
動的光散乱 (DLS) によるタンパク質の会合状態の評価.....	7
トリプシン限定分解 (TLP) によるドメイン構造の安定性の評価.....	7
サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱法 (SEC-MALS) による溶液中での多量体形成状態の解析.....	7
結晶化と構造決定.....	8
Discovery Studio および PDBePISA による結晶構造の解析.....	8
VASH1/SVBP 複合体の 1 ns 全アミノ酸 C α 原子分子動力学 (MD) シミュレーション.....	9
VASH1/SVBP 複合体の 100 ns 全原子分子動力学 (MD) シミュレーション.....	9
第3章 結果.....	11
発現コンストラクトの作製と VASH1/SVBP の精製.....	11
精製した VASH1/SVBP の性質評価.....	12
VASH1/SVBP の結晶化.....	12
VASH1/SVBP の結晶構造.....	13
MD シミュレーションによるナノ秒スケールでの挙動の解析.....	14
第4章 考察.....	16
第5章 図と表.....	20
第6章 参考文献.....	47
第7章 謝辞.....	51

要旨

本稿では、血管新生関連因子および微小管を形成する α -チューブリン C 末端の脱チロシン化酵素として同定された vasohibin タンパク質複合体の X 線結晶構造解析について纏めた。

vasohibin は血管内皮細胞が産生する血管新生因子として同定された。ヒトにおいて 2 つのサブタイプ vasohibin1(VASH1) と vasohibin2(VASH2) が存在し、どちらも small vasohibin binding protein(SVBP) と安定に複合体を形成し、細胞外へと分泌される。特に発生初期段階の血管内皮細胞で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)によって誘導され、VASH1 は血管新生に抑制的、VASH2 は亢進的に働くことが知られている。特にがんにおいては細胞増殖と共に血管新生は重要な役割を果たしており、多くのがん細胞で VASH2 の発現量の向上がみられた。

近年、血管新生やがんとは別に神経細胞伸長の領域において、vasohibin は α -チューブリンの脱チロシン化酵素として同定された。この報告を皮切りに、複数の結晶構造が報告された。結晶構造の決定により、SVBP との複合体形成や基質の認識、酵素活性の分子機構が明らかとなった。創薬ターゲットとしてより現実的な議論が可能になった一方で、vasohibin 酵素活性の制御や他の協働する因子との関係性、細胞外への分泌経路など不明な点が多く残っている。

本稿で明らかにした vasohibin の結晶構造は、報告された複数の結晶構造と全体的な構造は一致していたが、N 末端領域に大きな差異があった。そこで、詳細に比較して結果、本結晶構造においては、結晶中の 2 回転対称軸の隣接 VASH1 分子と N 末端領域を介してヘテロ四量体を形成していることが明らかとなった。ヘテロ四量体は 56 番目から 67 番目のアミノ酸残基から成る N 末端領域を相互に交換し合うことで安定化していた。N 末端領域の水素結合および疎水性結合のパターンは、ヘテロ二量体を形成する他の構造と異なることも明らかになった。さらに、分子動力学シミュレーションを行ったところ、ヘテロ四量体は全体構造の安定性が示唆されたことに加え、ヘテロ二量体に比べて N 末端領域の変動が抑制されていた。

本研究より、VASH1/SVBP 複合体において新規なヘテロ四量体の形成と N 末端領域の可動性が発見されたことで、酵素活性の制御機構ならびに細胞外分泌経路に関する新たな可能性が示唆された。

略語一覽

VASH	vasohibin
SVBP	Specific Vasohibin Binding Protein
aa	Amid Acid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (血管内皮細胞増殖因子)
MD	Molecular Dynamics (分子動力学)
MBP	Maltose Binding Protein
TEV	Tabacco Etch Virus
IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
DLS	Dynamic Light Scattering(動的光散乱)
TLP	Trypsin Limited Proteolysis(トリプシン限定分解)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SEC-MALS	Size Exclusion Chromatography Multi-Angles Light Scattering (サイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱)
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SASA	Solvent Accessible Surface Area(溶媒露出表面積)

第1章 序論

発達した組織(臓器)では血管がくまなく張り巡らされていて、酸素や栄養素等を循環させることで機能を維持している。もし発達段階の血管新生が停止してしまうと組織の成長は滞ってしまい、血管新生に歯止めがかからなければがんなどの腫瘍を誘発する恐れがある。血管新生を制御することはまさに生命のパイプラインを管理することと言える。組織よりも小さな細胞レベルで起きるイベントの中には、例えば細胞分裂時の染色体の分配や神経細胞の軸索成長など、微小管の伸縮が大きな役割を担っているものがある。微小管の伸縮に異常が起きると細胞分裂時の染色体分配の異常や、神経細胞の分化に異常をきたす可能性がある。一見あまり関係のないこれらの二つの生命現象に深く関与しているタンパク質が *vasohibin* である。

vasohibin は血管新生に関与する因子として最初に発見され、脊椎動物種の間で広く保存されている。2つの *vasohibin* パラログ、*vasohibin1* (VASH1) と *vasohibin2* (VASH2) は、前者が血管新生を阻害し、後者が血管新生を促進する機能を持つ (Sato, 2013)。*vasohibin* は、small *vasohibin binding protein* (SVBP) と複合体を形成し、非標準的な経路を介してプロセッシングおよび分泌される (Suzuki et al., 2010)。

近年、VASH/SVBP は腎小体のニューロンの発達と正常な基底膜形成に関与していることがわかった (Pagnamenta et al., 2019; Tanabe et al., 2018)。この経路において *vasohibin* は、ニューロンの分化を制御している、チューブリンの翻訳後修飾に関与している。VASH1/SVBP と VASH2/SVBP 複合体はどちらもカルボキシペプチダーゼとして機能し、 α -チューブリン C 末端のチロシン残基を切断する。このチロシン残基は α/β -チューブリン二量体形成に重要で、*vasohibin* はチューブリン重合脱重合反応サイクル制御の一翼を担っている (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017)。血管新生における機能は異なるが、共通の酵素活性を有するなど、2つのパラログの違いは不明瞭なままである。

一般的にプロテアーゼはその発現から機能するまでの間、複数の段階を経て不活性型から活性型へと調節される。例えば、トリプシンなどのセリンプロテアーゼは、不活性なチモーゲンの形でトリプシノーゲンとして発現され、後に切断されて活性化される (Stroud et al., 1977; Hedstrom et al., 1996)。そしてカルシウムがトリプシンに強く結合することで、プロテアーゼを安定化する (Caldwell, R. A. 1992)。アスパラギン酸プロテアーゼファミリーのペプシン、ガストリシン、レニンなどの他のプロテアーゼもチモーゲンとして発現され、プロテアーゼドメインに連なるプロセグメントを介して自己阻害される (Trudeau et al., 2013)。このプロセグメントはプロテアーゼドメインに結合し、対象因子のタンパク質分

解が始まるまでの間、不活性化状態を維持する (Dunn, 2002; Morales et al., 2012)。

vasohibin のアミノ酸配列解析により、vasohibin は Ca^{2+} 結合性トランスグルタミナーゼ様システインプロテアーゼに属することが推測されている (Sanchez-Pulido & Ponting, 2016)。VASH/SVBP 複合体の結晶構造からも、触媒活性部位が実際にトランスグルタミナーゼに類似することが示されている (Adamopoulos et al., 2019; Li et al., 2019; Liao et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019; Liu et al., 2019)。VASH/SVBP 複合体を観察すると、vasohibin の安定化や細胞外分泌に必要な SVBP は VASH の N 末端側構造領域に結合していた。チューブリンペプチドまたは阻害剤と複合体を形成した構造からは vasohibin の基質認識機構が明らかになった (Li et al., 2019; Liao et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019)。しかし、これらの結晶構造からは VASH/SVBP 複合体の動態や機能調節についての十分な知見は得られていない。

vasohibin は、無秩序で定まった二次構造を形成しない N 末端および C 末端領域を有している。加えて N 末端領域に関してはパラログ間での配列保存性が低い。先行研究により、VASH1 は Arg29 および Arg76 で切断されることがわかっている (Sonoda et al., 2006)。Arg29 での切断は構造的脆弱性に因ると考えられる。一方、Arg76 は SVBP 結合に関与する α -ヘリックスの一部であることから、この残基のプロセッシングは構造上の動的特性に因ると考えられるが、正確な性質は不明瞭なままである。そこで、この領域の特性と VASH1/SVBP 複合体の構造的動態の調査に着手した。今回構造決定した結晶構造は、他の VASH/SVBP 結晶構造には見られないヘテロ四量体を形成していて、プロテアーゼドメイン内の N 末端領域に可動性が発見された。本稿では、新たに発見されたヘテロ四量体と既存のヘテロ二量体構造を詳細に比較するとともに、分子動力学 (MD) シミュレーションを実行して、構造の可動性を比較した。

第2章 材料と方法

DNA クローニングとタンパク質調製

ヒト VASH1 は全長 364 アミノ酸残基で構成された分子量 40.825 kDa のタンパク質である。ヒト VASH1 と SVBP の二次構造および天然変性領域に関してそれぞれ PredictProtein (Yachdav et al., 2014) と DISOPRED (Jones and Cozzetto, 2015) を用いて予測をした。本論において、全長 VASH1 のうち 56 から 310 番目のアミノ酸残基を VASH1core (以後 VASH1c または VASH1 と表記) と定義した。ヒトの全長 VASH1 (2-365 のアミノ酸残基(以後 aa と表記する)) と全長 SVBP (2-66 aa) はともに pcDNA3.1 発現ベクター(Kadonosono et al., 2017)から遺伝子断片を PCR 法を用いて増幅した。PCR 産物を改変型 pMalc2x vector に導入し、MCS の N 末端側から MBP 精製タグ、6xhistidine タグ、5xTEV プロテアーゼ認識配列、VASH1c (56-310 aa) 、2xTEV プロテアーゼ認識配列、SVBP (2-66 aa) の順で共発現できるコンストラクト (CSBP255) を作製した。

CSBP255 を One shot BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) に形質転換し、100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地を用いて 30°C で一晩培養して大腸菌の選別を行った。選別後のコロニーを 100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 液体培地に植菌して 30°C で OD600 nm = 0.5 になるまで培養を行った。終濃度 0.2 mM になるように IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導し、さらに 48 時間培養を行った。培養液を遠心機 Avanti HP20 (BECKMAN) で JLA8.1000 ローター (BECKMAN) を用いて 6000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清を除いて Buffer A500 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl) で菌体を懸濁した。懸濁液を 50 ml チューブに分注し、遠心機 CR 21GIII (HITACHI), R18A ローター (HITACHI) を用いて 6000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心後、上清を除いて -80°C で凍結した。凍結した菌体を融解し Buffer A500 を 35 ml と EDTA-Free Protease Inhibitor (GE Healthcare) を加えて、ソニケーター (BRANSON, Duty: 20%, Output control: 10) を用いて氷上にて超音波で破碎した。破碎液を遠心機 CR 21GIII (HITACHI), R18A ローター (HITACHI) を用いて 12000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心を二度行い、上清を回収した。上清は 1.0 μm^2 と 0.45 μm^2 のフィルターを通したのち、AKTA pure (GE Healthcare) を使用して 10 ml MBPTrap HP カラム (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。溶出画分を回収し、精製タグを切断するために終濃度 1 mM の 2-Mercaptoethanol と 0.1 mg 程度の TEV protease を混ぜて、室温で一晩反応させた。反応液を BufferA0 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) で 5 倍希釈し、SP Sepharose HP カラム (GE Healthcare) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出用バッファーに BufferA100 (10 mM

Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl)から BufferA1000 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl) を用いて連続的な塩濃度勾配をつくり、目的タンパク質を精製した。回収した精製液を限外濾過カラム(Amicon Ultra, Millipore)で濃縮後、Superdex 200 (GE Healthcare) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、単一ピーク画分を最終精製物として回収した。タンパク質の結晶化のために再度限外濾過カラム (Amicon Ultra, Millipore)を用いて濃縮した後、微量透析膜を用いて溶媒を 10 mM CHES (pH 9.4) へと置換した。

動的光散乱 (DLS) によるタンパク質の会合状態の評価

精製した VASH1-SVBP 複合体の会合状態を解析するために Zetasizer μ V (Malvern Inc) を用いて動的光散乱測定を行った。タンパク質濃度の異なる 5 つの希釈系列 (0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml) に対してそれぞれ塩濃度の異なる 4 つの希釈系列(0, 100, 200, 300, 400, 500 mM)を合計 30 種類の測定用試料を調製した。各タンパク質溶液はマイクロキュベットに 3 μ l 入れ、3 回ずつ測定を行なった。測定結果は Zetasizer 専用のソフトウェア (Malvern Inc) を用いて解析した。

トリプシン限定分解 (TLP) によるドメイン構造の安定性の評価

精製した VASH1-SVBP 複合体の構造安定性とドメイン構造を解析するために、トリプシンを用いた限定分解を行なった。トリプシン濃度の異なる 4 つの希釈系列を調製し(0, 1, 10, 100 μ M)、2 mg/mL のタンパク質溶液 10 μ l に対して 1 μ L の 20 mM CaCl₂、7 μ L の BufferA0, 各濃度のトリプシンを 2 μ L 混ぜて、室温で 30, 60, もしくは 180 分間反応させた。4×SDS loading buffer を 6 μ l 添加して 95°C、5 分間の熱処理を行うことで反応を止め、SDS-PAGE を行い、Coomassie 染色をすることで目的のタンパク質を検出した。

サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱法 (SEC-MALS) による

溶液中での多量体形成状態の解析

精製した VASH1/SVBP 複合体の溶液中における多量体形成をサイズ排除クロマトグラフィー用カラム Superdex 200 increase 10/300 (GE Healthcare)と多角度光散乱検出器 Wyatt DAWN HELEOS II (Wyatt technology)を用いて解析した。カラムは精製した VASH1/SVBP 複合体の溶媒である Buffer A500 (10 mM Tris-HCl

(pH8.0), 500 mM NaCl)で平衡化し、測定する VASH1/SVBP 溶液は 10,000 × g で 15 分間遠心後、0.02 μm² のフィルターを通して凝集体を取り除いた。6 mg/ml 程度の VASH1/SVBP 溶液を 60 μl 程度インジェクション専用のガラスバイアル (Waters Total Recovery)に入れた。ガラスバイアルをカローセルに設置して VASH1/SVBP 溶液を Superdex 200 increase 10/300 カラムに流した。SEC-MALS のシステムの制御と測定結果の解析には専用ソフト Astra6 (Wyatt technology) を用いた。

結晶化と構造決定

VASH1/SVBP 複合体の結晶化のために、ゲル濾過精製後のタンパク質溶液を濃縮し、溶媒を 10 mM CHES (pH 9.4) へと置換してタンパク質濃度が 17.7 mg/ml となるように調製した。VASH1/SVBP 複合体の結晶化にはシッティングドロップ気液平衡法用の結晶化プレートと沈澱剤として NEXTal DWBlock JCSG Core Suite II 結晶化スクリーニングキット(Qiagen) を用いた。17.7 mg/ml のタンパク質溶液を 0.16 M 硫酸アンモニウム, 0.08 M 酢酸ナトリウム pH 4.6, 20% (w/v) PEG4000, 20% (v/v) グリセロールの溶液条件下で 20°C、数ヶ月間静置して VASH1/SVBP 複合体の結晶を作製した。作製した結晶は液体窒素で瞬間凍結し、つくばの放射光施設 PF-BL1A で X 線回折データを測定した。回折データは XDS (Kabsch, 2010)を用いて処理し、PHENIX package (Liebschner et al., 2019)を用いて VASH1-SVBP 複合体(PDB ID = 6NVQ)を基にした分子置換法によって構造決定を行なった。構造決定により得た構造モデルを PHENIX と COOT (Emsley et al., 2010)を用いて立体構造の最適化を行なった。最終的に得られた立体構造 (PDB ID = 6LPG) は VASH1 (Chain A: 56 - 304 aa) と SVBP (Chain B:26-53 aa) から成り、4つの硫酸イオンと 76 個の水分子を含んでいた。本論中で図示した立体構造は COOT と BIOVIA Discovery Studio (Dassault systems, Velizy-Villacoublay, France) ならびに VMD (Humphrey et al., 1996) を用いて作成した。

Discovery Studio および PDBePISA による結晶構造の解析

VASH1/SVBP 複合体の X 線結晶構造 (PDB ID = 6LPG) の詳細と他の VASH1/SVBP 二量体構造との比較を行うために、BIOVIA Discovery Studio (Dassault systems, Velizy-Villacoublay, France) と PISA Server (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) を用いて解析した。複数種類の VASH1/SVBP 複合体の重ね合わせには Discovery Studio の Align Sequences and Structures および Superimpose Proteins プロトコルを用いた。

VASH1/SVBP 四量体 (PDB ID = 6LPG) と VASH1/SVBP 二量体 (PDB ID = 6J7B, 6OCF) の N 末端領域 (57-69 aa) の詳細な相互作用解析には Discovery Studio の View Interactions プロトコルと PISA Server を用いて計算し、二次元相互作用マップの作図には Discovery Studio の 2D Diagram を利用した。

VASH1/SVBP 複合体の 1 ns 全アミノ酸 C α 原子分子動力学 (MD)

シミュレーション

N 末端領域 (56-69 aa) の揺動性を調べるために VASH1/SVBP 四量体 (PDB ID = 6LPG) と VASH1/SVBP 二量体 (PDB ID = 6J7B) をモデルとして構造中の P アミノ酸の C α 原子に対して分子動力学法を用いたシミュレーション (MD シミュレーション) を行った。1 ns の MD シミュレーションは BIOVIA Discovery Studio (Dassault systems, Velizy-Villacoublay, France) を用いて解析した。はじめにモデル構造に対して Protein Report および Prepare Protein プロトコルを用いてアミノ酸配列の変異を除き、Minimization プロトコルを用いて力場パラメーターに CHARMM (Brooks et al., 2009) を適用してシミュレーションの初期構造を準備した。N 末端領域 (56-69 aa) から半径 5.5 Å 以内を除き Harmonic restraint を適用した。各初期構造を元に Standard Dynamics Cascade プロトコルを用いてシミュレーションを行った。最初に初期構造に対して最急降下法と共役勾配法をそれぞれ 5000 ステップ行いによって自由エネルギーを最小化した。次に温度を 1000 ps で 1~300 K に直線的に上昇させた。300 K で 1000 ps 間平衡化し、1000 ps (1 ns) の MD シミュレーションを行った。ファンデルワールス力と静電相互作用にはそれぞれ 14 Å と 11 Å のカットオフ距離を適用した。MD シミュレーションには 2 fs の時間ステップを適用し、SHAKE アルゴリズムによって制約した (Ryckaert et al., 1977)。構造とエネルギーは 10 ps ごとにサンプリングした。仮想溶媒モデルには Generalized Born with a simple Switching (GBSW) (Dominy, B. N. & Brooks, C. L. 1999) を用いた。

VASH1/SVBP 複合体の 100 ns 全原子分子動力学 (MD) シミュレ

ーション

N 末端領域 (56-69 aa) のより詳細な揺動性と機能的意義を調べるために、VASH1/SVBP 四量体 (PDB ID = 6LPG) と VASH1/SVBP 二量体 (PDB ID = 6J7B, 6OCF) をモデルとして構造中の全原子分子動力学法を用いたシミュレーション

(MD シミュレーション)を行った。MD シミュレーションを行う前に、各モデルの結晶構造中の水分子や阻害剤などを含むリガンド分子を除去した。Amber (Case et al., 2018) の tleap プログラムを使用して、電荷の偏りを Cl⁻イオンで中和し、TIP3P 水モデルを使用してボックス内の溶媒和とした。ウォーターボックスの壁とタンパク質の原子の間の距離 x、y、z 方向で 12 Å に設定し、周期境界条件はすべてのシミュレーションシステムに適用した。力場パラメーターには Amber ff14SB (Maier et al., 2015) を適用した。

最初に 1000 ステップの最急降下法、続いて 1000 ステップの共役勾配法によって結晶構造の自由エネルギーを最小化した。次に、温度を 1 気圧で 100 ps の間、1~310 K に直線的に上昇させた。平衡化のために 310 K および 1 atm で追加の 100 ps MD シミュレーションを行った後、複合体の構造特性を分析するために 100 ns MD シミュレーションを実行した。ファンデルワールス力と静電相互作用には 12 Å のカットオフ距離を適用し、長距離間の静電相互作用は粒子メッシュエバルト法を用いて計算した。すべての MD シミュレーションに 2 fs の時間ステップを適用し、水素を含むすべての結合を SHAKE アルゴリズムによって制約した (Ryckaert et al., 1977)。構造とエネルギーは 2 ps ごとにサンプリングした。温度に関してはランゲビンサーモスタット (Loncharich et al., 1992) によって 1.0 ps⁻¹ の衝突頻度で制御した。圧力に関してはベレンゼンバロスタット (Berendsen et al., 1984) によって 1.0 ps の圧力緩和時間で制御した。各 VASH1/SVBP 複合体について、ランジュバンサーモスタットの異なる 3 つの独立した MD シミュレーションを実行した。また、MD シミュレーションの分析のために、最初の 10 ns の軌道を削除した。各複合体の C α 原子の二乗平均平方根変動 (RMSF) は、サンプリングされた構造を平均構造に重ね合わせた後に計算した。VASH1/SVBP ヘテロ四量体の場合、A 鎖 (VASH1) とその対称鎖である D 鎖 (VASH1) の RMSF 値を個別に計算して、局所的な変動に対する AD 鎖間の相対運動の影響を取り除いた。すべての MD シミュレーションとその分析は、Amber18 および AmberTools18 パッケージを使用して実行した (Case et al., 2018)。

第3章 結果

発現コンストラクトの作製と VASH1/SVBP の精製

ヒト VASH1/SVBP の構造を解析するために、はじめに二次構造予測および天然変性領域予測ソフトを用いてアミノ酸配列から構造的特徴を調べた。その結果 364 アミノ酸残基からなる全長 VASH1 の N 末 C 末両端が構造安定性の低い天然変性領域であることがわかった (図 1A)。また、SVBP は全体的に α ヘリックス二次構造を形成するが、同時に天然変性タンパク質であると予測された (図 1B)。この結果は SVBP 単独では安定的にタンパク質が発現しない結果と一致していた (表 1)。そこで VASH1 の発現領域を変えた複数の発現コンストラクトを作製し、タンパク質の発現量を定性的に比較した (図 1C)。その結果、全長 VASH1(2-365 aa)、 Δ C(2-310 aa)、 Δ N(56-365 aa)、Core(56-310 aa)の順で発現量が増加した、特に N 末端の天然変性領域がタンパク質の発現に影響を与えることが示唆された。NC 両末端を削除した VASH1(56-310 aa) と 全長 SVBP(2-66 aa) の共発現コンストラクト CSBP255(図 1D)の発現と可溶性を検証したところ、安定して発現し可溶性も高いこと確かめられた(図 1E)。なお、CSB_P_0267 は発現ベクターの違いにより発現量が CSBP255 よりも低く、CSB_P_0254 と CSB_P_0256 は同等量の発現を示したが VASH1 と SVBP 間に TEV protease 認識配列を有し、かつ長さの短い CSBP255 を発現コンストラクトとして選択した(表 1)。

CSBP255 を大腸菌 BL21Star+pLysS 株もしくは Rosetta+pLysS 株に形質転換して培養した菌液を超音波破碎、遠心分離を行って可溶性タンパク質溶液を回収した。回収したタンパク質溶液を His タグを用いたアフィニティー精製を行なった(図 2A, 2B および 2C)。素通り画分(1~5 レーン)と溶出画分(6~12 レーン)を SDS-PAGE により検出した結果、発現した MBP_{his} 精製タグ付き VASH1/SVBP の精製が確認された(図 2C)。次に TEV protease により精製タグの切断をした後、精製タグ切断産物を陽イオン交換カラムで精製した。(図 2D,2E および 2F)。このとき、100 mM から 1 M までの塩濃度勾配をかけて溶出することで精製タグ切断産物(VASH1/SVBP)と未切断物(MBP-VASH1/SVBP)を選り分けた(図 2F)。未切断物(MBP-VASH1/SVBP)の混入がより少ないピーク(図 2E の 6~8 番目の溶出画分)を回収し、最後にゲル濾過精製を行った。左右対称な単一の溶出ピークを示す純度の高い VASH1/SVBP 溶液を回収した (図 2G,2H および 2I)。

精製した VASH1/SVBP の性質評価

精製した VASH1/SVBP 溶液を用いて動的光散乱(DLS)とトリプシン限定分解(TLP)を行い、VASH1/SVBP の性質を評価した。DLS により溶液中での分子の会合状態を測定した結果、VASH1/SVBP 複合体は塩濃度やタンパク質濃度に依存せずに単分散状態で存在していた(図 3A)。この結果は溶液中の VASH1/SVBP 分子が単一の状態で存在していることを示している。VASH1/SVBP 複合体の粒子径は、6.82 nm 前後であった(図 3B)。

次に、トリプシン限定分解を行なって、VASH1/SVBP 複合体のドメイン構造とその安定性を評価した(図 3C)。VASH1 と SVBP はともに低トリプシン濃度では安定であった。しかし、より高いトリプシン濃度では反応開始 30 分後に SVBP が部分的に分解され、180 分後には SVBP が完全に分解された。このとき点で、VASH1 にもわずかに分解がみられた。SVBP の N 末端 15 残基は天然変性領域で、トリプシンの切断標的であるアルギニンおよびリジン残基を含んでいる。以上の結果から、精製された VASH1/SVBP 複合体は安定であるが、SVBP の一部は比較的柔軟であり、SVBP の分解後、VASH1c も軽度の分解を起こしやすく、N または C 末端付近の数アミノ酸残基が切断されることが示唆された。

また、回収した VASH1/SVBP 溶液を用いてサイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱法(SEC-MALS)を行い、溶液中での多量体形成の状態を調べた。その結果、溶液中ではほとんどの VASH1/SVBP 複合体が 34 kDa であり、VASH1 と SVBP が 1:1 の割合でヘテロ二量体を形成していることが示唆された(図 3D)。また、溶液中において少数ではあるが 89 kDa の多量体も形成されていた。

VASH1/SVBP の結晶化

精製した VASH1/SVBP 溶液は性質評価により十分な純度と均一性、安定性が検証されたため、続いて構造解析に向けて結晶化を行なった。タンパク質溶液の濃度や溶媒や添加物の種類を変え、結晶化用プレート上で多種類の沈殿剤と組み合わせることで約数千の結晶化条件を検証した。その結果、タンパク質濃度が 17.727 mg/ml の VASH1-SVBP 溶液を 0.16 M 硫酸アンモニウム、0.08 M 酢酸ナトリウム(pH4.6)、20% PEG4000、20%グリセロールの混合液と 1:1 で混ぜ合わせて 20°C で数ヶ月静置した条件下で六角柱状結晶の形成が観察された(図 4A)。この結晶に X 線を照射することで高解像度の回折データが得られた(図 4B, 表 2)。

VASH1/SVBP の結晶構造

VASH1/SVBP の立体構造を得るために、分子置換法を用いて空間群 P6122 の結晶構造を最高解像度 2.3 Å で決定した (図 5A, 表 2)。VASH1/SVBP 二量体の全体的な構造は既に報告された結晶構造 (表 3) との RMSD の値が 0.42 Å と極めて高い相関を示した (図 5B)。新たに取得した結晶構造 (PDB ID = 6LPG) では 4 つの硫酸イオンが VASH1/SVBP の塩基性表面に結合していた。既に報告されていた他の VASH/SVBP 結晶構造の一部でも、同様に塩基性表面に結合した硫酸イオンまたはリン酸イオンが観測されていた (Li et al., 2019; Wang et al., 2019)。興味深いことに、硫酸イオンの 1 つは活性中心の近傍にあり、Tyr134、Ser221、および Arg222 と相互作用していた (図 5C)。これらの 3 アミノ酸残基は、チューブリンペプチドと epoY 阻害剤を直接認識するために重要であることが先行論文で明らかになっている (Liao et al., 2019; Li et al., 2019)。VASH1/SVBP は、酸性アミノ酸であるグルタミン酸残基が豊富な α -チューブリン C 末端領域に結合することが知られている。したがって、結合した硫酸イオンは、ペプチド/阻害剤の相互作用を模倣している可能性がある。

全体的な構造的特徴は既に報告された VASH1/SVBP 構造と一致していたが、今回報告した結晶構造(6LPG)の N 末端領域 (56-69 aa) のみ他の構造とは重ならず、相関性の高い VASH1/SVBP の中心部分から突出していた (図 5B)。また、外側へと伸長した N 末端領域 (56-69 aa) は結晶学的対称性をもつ隣接する VASH1/SVBP 分子に挿入され、ヘテロ四量体を形成していた (図 5D)。また、報告されていた結晶構造の中には、N 末端領域 (56-69 aa) の電子密度がみえない構造もあり、VASH1/SVBP ヘテロ四量体は、N 末端領域 (56-69 aa) が局所的に構造変化を起こす可能性を示唆した。

N 末端領域 (56-69 aa) に着目して、局所的な構造の差異を最も顕著に示す 2 つの結晶構造 (6J7B と 6OCF) を選択して 3 つの構造を重ね合わせた。その結果、Gly65 の位置が大きく異なり、ヘテロ四量体を形成している 6LPG の Arg64 の側鎖は反対方向を向いていた (図 6A)。cis-Pro68 より前の N 末端領域は大きな局所的構造変化を起こしていたが、Pro68 に続く Val69 以降は α -ヘリックスを形成し、高い相同性を示していた。N 末端領域の変化の大きさを測定するために、Glu71-Pro68-Arg64 の C α 原子がなす角度を測定したところ、ヘテロ四量体は角度が 112° と最も大きかった。一方、ヘテロ二量体はより角度が小さく (6OCF : 95°, 6J7B : 74°)、6J7B においては鋭角を成していた。また、N 末端領域の主鎖二面角を比較したところ、Gly65 と Gly66 で大きく異なり、ペプチドの反転を示していた (表 4)。これらの構造変化によって、ヘテロ四量体では Gly56 から Arg64 までの領域が、隣接する VASH1/SVBP 分子の中心部の窪みに挿入さ

れていた (図 6B)。

N 末端領域 (56-69 aa) の差異をより詳細に分析するために、PDBePISA サーバー (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) と Discovery Studio を用いて解析した。相互作用界面はヘテロ四量体とヘテロ二量体の間で類似していたが、ヘテロ四量体はヘテロ二量体と比較してより多くの相互作用を有しており、その結果、溶媒和自由エネルギー値が低くなった可能性が考えられる。(図 6 および表 5)。ヘテロ四量体では、Val62 から Gly66 が対称分子の同じ領域間 (Val62 から Gly66) と水素結合を形成していた。また、隣接分子から挿入された N 末端領域は VASH1/SVBP 中心部分の Val69、Met77、Phe142、および Phe141 との相互作用を形成していた (図 6C)。他のアミノ酸間での相互作用は、ヘテロ四量体とヘテロ二量体で同様に観察され、Phe60、Phe61、および Arg64 は 3 つの構造すべてで相互作用に参与していた (図 6C、6D、および 6E)。特に、6OCF は VASH1 コア領域 (N 末端領域 (56-69 aa) を除いた構造一致度の高い領域) との最小限の相互作用によって安定化されていた (図 6E)。したがって、四量体結晶構造は、N 末端領域の可動性と広範な相互作用をもたらす安定化に貢献する可能性が見出された。

MD シミュレーションによるナノ秒スケールでの挙動の解析

ヘテロ四量体の構造決定により N 末端構造がもつ可動性とヘテロ二量体との結合様式の差異を新たに発見した。そこで、N 末端領域 (56-69 aa) がどの程度の可動性を有しているのかを検証するために、まずは 1 ns 間の簡易的な MD シミュレーションを行った。

本研究で結晶構造決定をした 6LPG を元にした N 末端領域 (56-69 aa) に相互作用がない状態と結晶構造 6J7B の N 末端領域 (56-69 aa) に分子内相互作用を持つ状態を初期構造とした 1 ns MD シミュレーションを行い、N 末端領域 (56-69 aa) の揺動性を比較した。N 末端領域 (56-69 aa) に相互作用がない状態 (6LPG) に比べ、分子内相互作用を持つ状態 (6J7B) では Val62 と Gln140 との間に形成する水素結合によって N 末端領域 (56-69 aa) の動きに制限がかかっていた (動画 1、図 6D)。相互作用がない状態に比べると N 末端領域の揺動性は小さいが、6J7B の MD シミュレーションにおいても 1 ns という短い時間の中で、N 末端領域 (56-69 aa) 全体としては相互作用部位から外側に向かって揺動する様子が観察されたことから、結合様式の差異が N 末端領域の揺動性に影響を与える可能性が示唆された。そこで次に、より詳細で長い時間 MD シミュレーションを行うことで N 末端領域 (56-69 aa) の性質を検証した。

ヘテロ四量体とヘテロ二量体 (6J7B と 6OCF) の 100 ns MD シミュレーショ

ンを3回実行して、N末端領域の構造の可動性や安定性を解析した。3つの複合体のC α -RMSDはシミュレーション時間全体で3.5 Å未満であり(図7A, 7Bおよび7C)、VASH1の全体的な構造は、二量体か四量体かに関わらず、安定していることを示唆していた。

VASH1のN末端領域には5つの連続した疎水性残基(58から62までのVPFFV(VPFFV58-62))があり、活性中心を含むVASH1中心部分との疎水性コアの形成に寄与している。そこでシミュレーション時間に伴うN末端領域の揺動性を表す指標として、ヘテロ四量体のA鎖およびD鎖、ヘテロ二量体(6J7Bおよび6OCF)のVPFFV58-62の溶媒接触表面積(SASA)を計算した(図7D, 7E, および7F)。興味深いことに、SASA値が6J7Bと6OCFの100 nsの間に350 Å²前後で変動する一方、ヘテロ四量体のSASA値は100 nsの間安定して約150 Å²程度を維持していた。例外的に2番目のシミュレーションではVASH1(A鎖)のN末端が初期段階でVASH1の疎水性コアから解離し、シミュレーション全体で大きく変動していた(図7G, 7Hおよび動画2)。

VASH1 N末端領域のC α 原子の二乗平均平方根変動(RMSF)を計算したところ、2番目のシミュレーションのA鎖を除いてヘテロ四量体のRMSF値がヘテロ二量体よりもわずかに低く、ヘテロ四量体では観察されないピークがヘテロ二量体では複数存在した(図7I, 7J および7K)。そこで、ピークが観測されたアミノ酸の相互作用を分析した。ヘテロ二量体におけるループ領域のArg64-Gly65のピークはヘテロ四量体ではみられず、対称分子の同じ領域にあるVal62とGly66の主鎖骨格間に形成された水素結合によって抑制された可能性が考えられる。(図3A)。同様にヘテロ二量体においてみられたGlu71とArg76の2つのピークは、ヘテロ四量体ではVASH1のArg76と隣接するSVBPのGlu28の間の水素結合によって抑制された可能性が考えられる(図1D)。さらに、ヘテロ四量体では、シミュレーション中に2つの二量体間で構造的ねじれが生じる様子が観察された(動画3)。2つの二量体は主にN末端領域を介して結合しているため、N末端領域ならびにSVBP周辺を軸とした回転運動が起こる可能性がある。100 ns MDシミュレーションの結果は、ヘテロ四量体とヘテロ二量体の間でN末端領域の可動性に差異があることを示唆した。

第4章 考察

本研究により新たに四量体の形成したヘテロ VASH1/SVBP 複合体の結晶構造が確認された。結晶構造の詳細な観察により、VASH1/SVBP ヘテロ四量体の活性中心の構造的特徴や VASH と SVBP 間の結合様式は、既に報告された VASH1/SVBP 二量体と非常に高い構造類似性を示していた。一方、VASH1 の N 末端領域 (56-69 番目のアミノ酸) に関してのみ、他の結晶構造と結合様式が異なっていた(図 5 および図 6)。ヘテロ四量体では N 末端領域が VASH1/SVBP ヘテロ二量体間で相互交換され、隣接する VASH1/SVBP と相互作用を形成していた。MD シミュレーションによる VASH1/SVBP ヘテロ四量体構造の崩壊はなく(図 7A, 7B および 7C)、VASH1/SVBP ヘテロ四量体のエネルギー安定性がヘテロ二量体に比べて高いことから(表 5)、生体内でも四量体を取りうる可能性が十分に考えられる。他の VASH/SVBP 二量体の中にも N 末端領域の結合様式が異なる構造(6J7B, 6OCF)があり、ヘテロ四量体の構造が明らかになったことで、今まで十分に調べられていなかった N 末端領域に関して議論ができるようになった。

N 末端領域 (56-69 aa) の役割と構造的可動性が持つ重要性は何か。N 末端領域のない VASH1/SVBP 結晶構造が複数存在することから (Liao et al., 2019)、VASH1 は SVBP に N 末端領域非依存的に結合可能で、二量体形成には関与しないと考えられる。VASH1 は生体内で翻訳後のプロセッシングを受け、メジャーに存在しているプロセッシングバリエーションが VASH1 (29-365 aa) と VASH1 (77-365 aa) の 2 種あることが知られている。そのうち N 末端領域 (56-69 aa) を欠損しているバリエーションは血管新生を抑制する機能は保持されているが細胞外へ分泌されなくなる (Sonoda et al., 2006)。

本研究から N 末端領域の可動性とヘテロ四量体の安定性ならびに VASH1 の Arg76 と SVBP の Glu28 間の相互作用の存在が明らかとなった。この結果から、N 末端領域の可動性が四量体形成に寄与していることが示唆される。四量体の形成によって、VASH1 プロテアーゼ活性を負に制御している可能性が考えられる。N 末端領域に起因する自己抑制/プロセッシングによる酵素活性の制御はレニンなどのプロテアーゼでも観測されていて、N 末端領域のプロセグメントがプロテアーゼドメインと結合してβシートを形成し、活性部位をブロックすることで起こる (Morales et al., 2012)。また、タンパク質の同分子間で末端のドメインが交換されて分子形態と機能が変化するドメインスワッピングという現象が知られている (Liu and Elsenberg 2002; Arbing et al., 2010; Ghosh et al., 2019)。実際に、先行論文により明らかになった VASH/SVBP 二量体を詳細に観察すると、N 末端領域の可動性を示唆する結果が多数みられる。VASH1/SVBP-epoY 構造では、

N末端領域の Phe60 が epoY 阻害剤の近傍に位置しているが (Liao et al., 2019)、阻害剤を含まない構造では、Phe60 の側鎖が回転して向きが異なっていた (Li et al., 2019)。同様に VASH2/SVBP-epoY 結晶構造では、Phe60 に対応する Phe49 も epoY 阻害剤の近傍に位置していた (Wang et al., 2019)。これらは N 末端領域の構造変化が基質との結合に重要である可能性を示唆している。また、 α -チューブリン末端との複合体形成には N 末端領域欠損型の VASH1 (70-306 aa) が使用され (Liao et al., 2019)、VASH2-SVBP と擬似 α -チューブリン末端との複合体では、Phe49 の側鎖が無秩序でモデル化されていなかった。このことは N 末端領域の活性中心近傍への結合によって基質結合を抑制する可能性を示唆している。さらに、N 末端領域の可動性は、ヘテロ四量体形成時に隣接する SVBP が接触することで部分的に抑制されていた (図 6 および図 7)。したがって、ヘテロ四量体形成時には、ヘテロ二量体形成時と比べて、N 末端領域の可動性が低下することで基質結合能が抑制される可能性が考えられる。

ヘテロ四量体は構造的に Arg76 のプロセッシング切断を防ぐ可能性がある (図 5E)。MD シミュレーションでは、ヘテロ四量体形成時の相互作用領域を軸とした回転運動を起こしていた (動画 3)。回転運動によって N 末端領域が切断されることで VASH1/SVBP 複合体は完全に機能するヘテロ二量体へと移行するならば、ヘテロ四量体は自己抑制/プロセッシング制御において極めて重要である。近年、他研究グループからクライオ電子顕微鏡を用いた VASH1/SVBP 二量体の微小管との結合状態の三次元構造が報告された (Li et al., 2020)。VASH1/SVBP 二量体と微小管の結合状態では、四量体形成時の二量体界面が結合に有意に寄与していたが、四量体では空間的に微小管と衝突してしまい、結合が困難であることが示唆された (動画 4)。したがって、N 末端領域の可動性と四量体の形成により、VASH1 が不活性な構造に固定され、基質の結合や触媒作用または代謝回転が妨げられる可能性が考えられる。

また、VASH1/SVBP にはシグナル配列が存在せず、小胞体にも局在しないことから、細胞外への分泌経路は一般的な小胞体を介した膜輸送に依存しないことが知られている (Kadonosono et al., 2017; Suzuki et al., 2010)。さらに先述の通り、Arg76 でのプロセッシングによって VASH1/SVBP の細胞外分泌が変化する (Sonoda et al., 2006)。ヘテロ四量体の形成自体が細胞外分泌に関与している可能性とともに、Arg76 のプロセッシングを妨げることで、酵素活性の負の制御のみならず、細胞外への分泌をも制御している可能性が考えられる。

VASH1/SVBP および VASH2/SVBP 複合体の研究は医学的な分野において先行していたが、 α -チューブリンの脱チロシン化酵素として同定された後 (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017)、構造及び生化学的な研究が盛んになった。NC 両末端を削った VASH1 (52-310) /SVBP 複合体の生化学的分析により、 α -チュ

ープリン末端のアミノ酸残基に対する K_m 値が $7.9 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} が 44.5 min^{-1} であることが明らかになった (Li et al., 2019)。また、VASH1 (52-310) /SVBP 複合体と微小管との結合状態および微小管に対する酵素活性が明らかとなった (Li et al., 2020)。しかし、依然として全長 VASH1/SVBP 複合体と短縮型 VASH1/SVBP 複合体の詳細な酵素活性の差異は報告されていない。さらに、N 末端領域 (56-69 aa) の有無が及ぼす酵素活性への影響、ひいてはヘテロ二量体とヘテロ四量体の活性能比較は調べられていない。

全長 vasohibin の天然変性領域である NC 両末端の機能に関する議論もまた不十分である。VASH1 と VASH2 のサブタイプ間の配列相同性が高く (図 8)、NC 両末端を除いた立体構造は酷似している。しかし、血管新生におけるサブタイプ間の機能は相反しており、その機能差が何に起因するのか定かではない。VASH1 と VASH2 の配列を比較すると (図 8)、N 末端領域 (56-69 aa) よりもさらに前の構造が見えていない領域 (2-55 aa) の配列相同性は低く、サブタイプ間の機能の違いを特徴付けている可能性がある。加えて本研究で着目した N 末端領域 (56-69 aa) の直前の配列には局所的に酸性アミノ酸残基が保存されていて、特に VASH1 の 14 残基程度の配列は基質である α -チューブリンの C 末端配列に酷似している (図 8)。N 末端領域 (56-69 aa) は構造的可動性に加え、結合している疎水性領域の位置が活性中心の近傍にあり、N 末側に伸長すると酸性アミノ酸に富む配列を持っている。この事実は塩基性に富む活性中心との相互作用を示唆し、本研究で提案した酵素活性の負の制御機構を支持している。

また共同研究者が本研究で着目した N 末端領域に含まれる 10 個のアミノ酸残基 (56-67 aa) 欠損時の細胞内で過剰発現させ、VASH1 の挙動と酵素活性を解析した。その結果、全長 VASH1 発現時と比較して VASH1 (Δ 56-67) 発現時では、局在などの変化はほとんどないものの、定性的ではあるが酵素活性の若干の向上が観察された (未公開データのため非参照)。本研究から得られた知見により、培養細胞や動物を用いた血管新生やガンの研究に新しい方向性がみえてきた。

本稿において、VASH1 の N 末端領域の可動性によるヘテロ四量体の形成が、酵素活性の自己阻害による負の制御ならびに細胞外分泌経路の制御において重要な機構であると提唱した。vasohibin は細胞内での微小管の機能を調節と神経細胞の分化や血管新生時の調節といった細胞と組織の異なる現象に関与し、特に発生段階において、生命活動の基盤づくりに寄与している。ヘテロ四量体形成による活性と分泌の制御機構の発見は、かけ離れていた細胞と組織における現象を結びつけ、今後の生物学的および医学的な研究の発展に貢献するだろうと考えている。この制御機構が実証されれば、細胞内での生物学的な作用機序のみならず、血管の新生やがんの浸潤転移といった医学的な領域におけるより実践的な研究も進展するだろう。現在は、ヘテロ四量体の構造決定に続き、作製した

基質ペプチドを用いて N 末端領域（56-69 aa）の変異体を含む酵素活性の評価および溶液中でのヘテロ四量体形成を維持する条件の検討を行なっている(表 1)。今後、N 末端領域の可動性や機能への影響を詳細に解析することで、ヘテロ四量体形成による制御機構の解明に近づくと期待している。

第5章 図と表

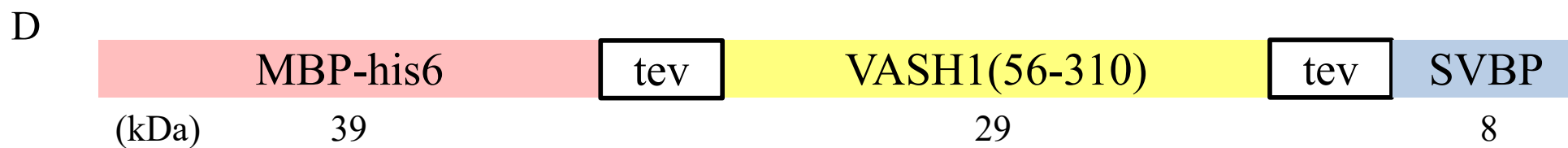
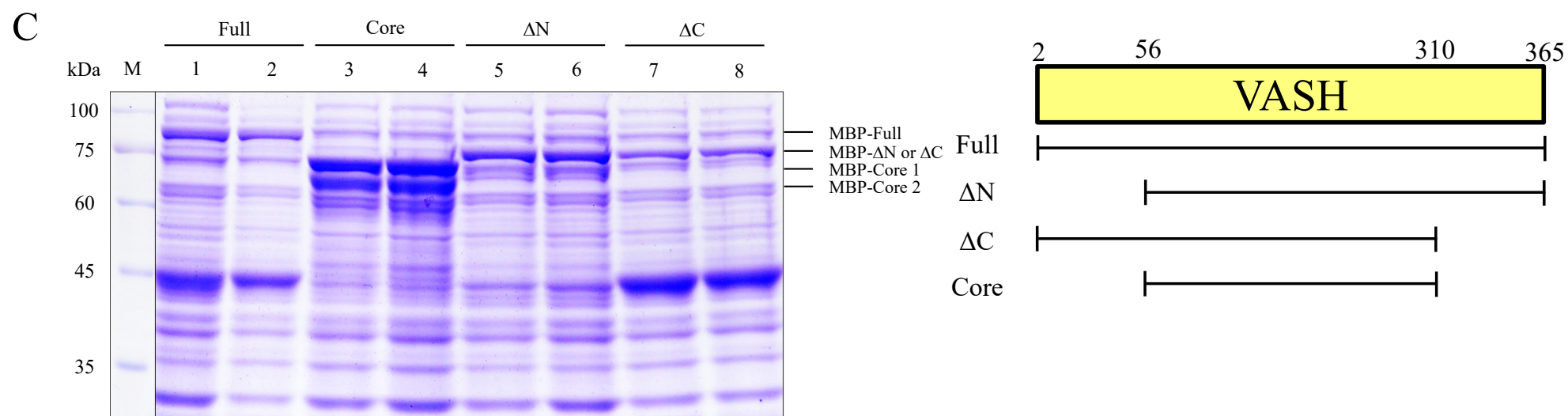
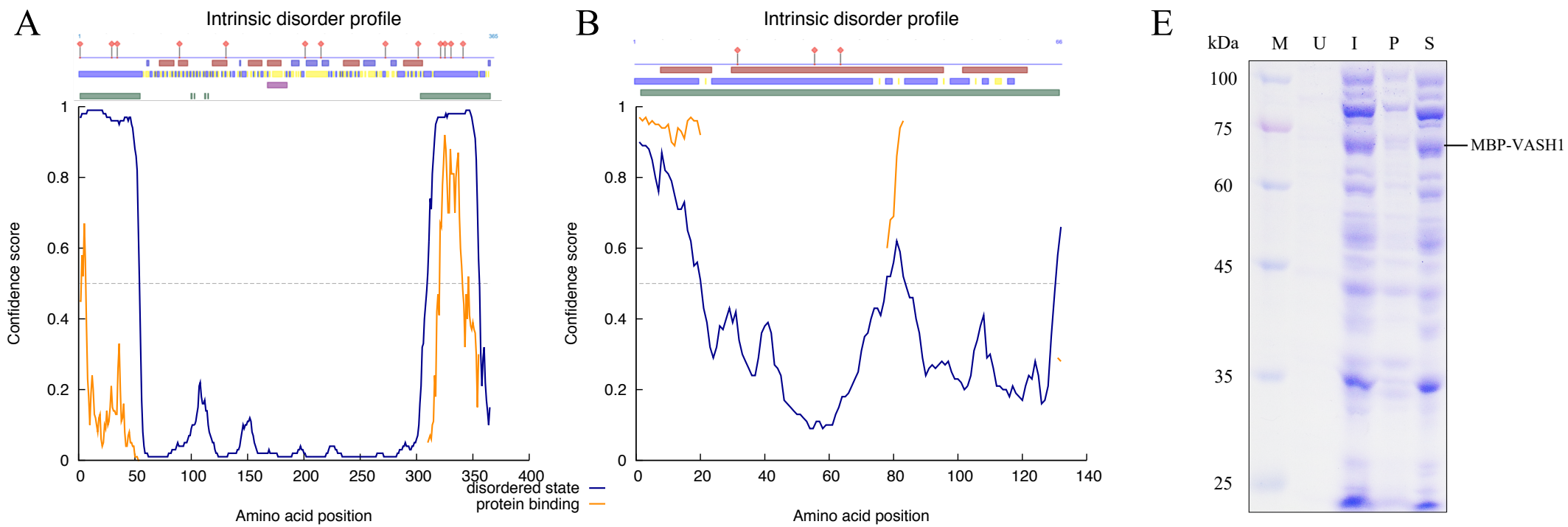


図 1. VASH1/SVBP 複合体発現コンストラクトの作製と発現タンパク質の可溶性評価

(A) VASH1 の二次構造と天然変性領域予測の結果

DISOPRED と PredictProtein を用いてアミノ酸配列からヒト VASH1 の構造予測を行った。折れ線グラフで表示された DISOPRED の結果の上に PredictProtein の結果を表した模式図を示した。DISOPRED の横軸はアミノ酸番号、縦軸は天然変性の度合いを表している。青線の値が大きいほど二次構造を取りにくいと予想される。また、オレンジの線は相互作用の起こりやすいアミノ酸領域を表している。PredictProtein も同様に横方向にアミノ酸配列番号が表記されている。模式図上部のピンのマークが相互作用を起こしうるアミノ酸領域を示している。その下の横軸の赤と青の棒が予測された二次構造を表しそれぞれ α ヘリックスと β シート構造を表している。さらに下の横軸が溶媒露出領域、最下部の軸が天然変性領域の予測を表している。

(B) SVBP の二次構造と天然変性領域予測の結果

DISOPRED と PredictProtein を用いてアミノ酸配列からヒト SVBP の構造予測を行った。詳細は(A)と同様である。

(C) MBP-VASH1/SVBP の発現領域の模式図と発現量の比較

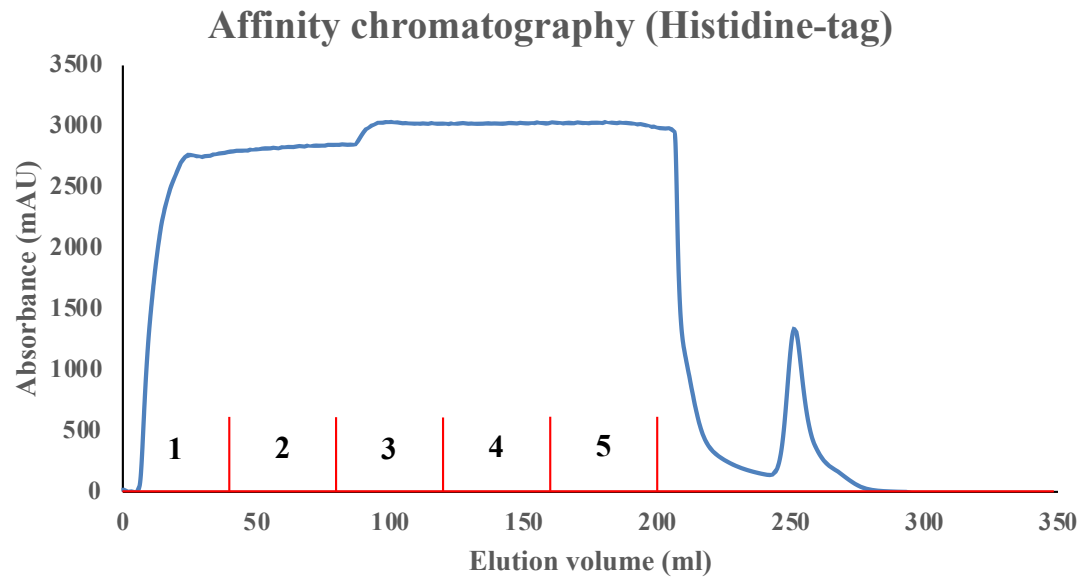
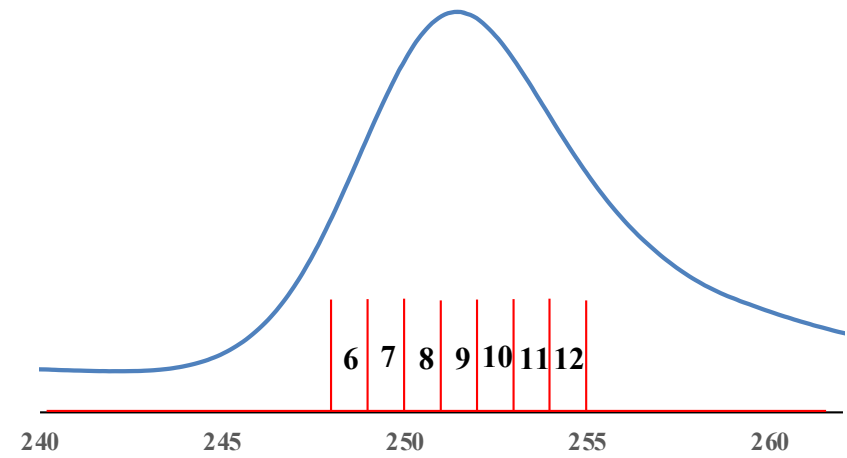
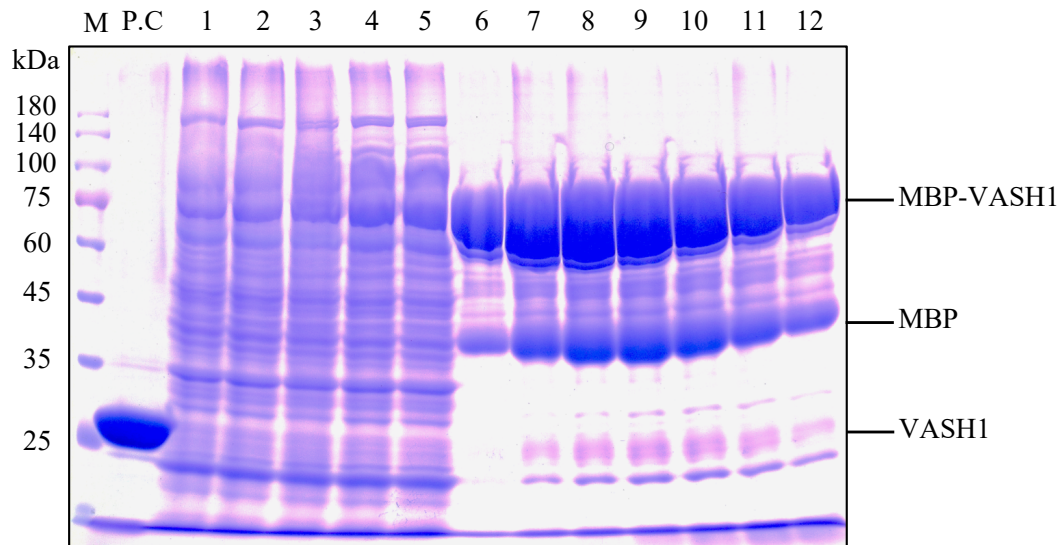
VASH1/SVBP の全長を Full、N 末端側から 55 番目のアミノ酸残基までを欠損させた領域を Δ N、311 番目のアミノ酸残基から C 末端のアミノ酸までを欠損させた領域を Δ C、NC 両末端を欠損させた領域を Core とした。左図の SDS-PAGE ゲル泳動写真では各発現領域と全長 SVBP を pMalc2x vector 改変ベクターに組み込みタンパク質の発現量を定性的に比較した。このとき、各発現コンストラクトで異なるコロニーを 2 つずつ無作為に選び、発現させた (Full : 1,2, Core : 3,4, Δ N : 5,6, Δ C : 7,8)。

(D) MBP-VASH1/SVBP 共発現コンストラクトの模式図

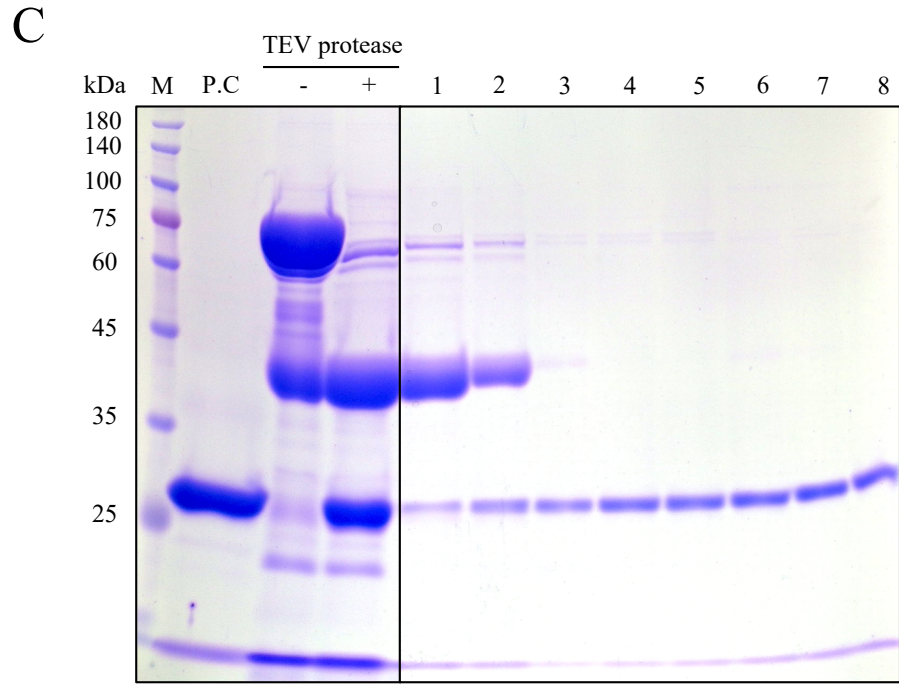
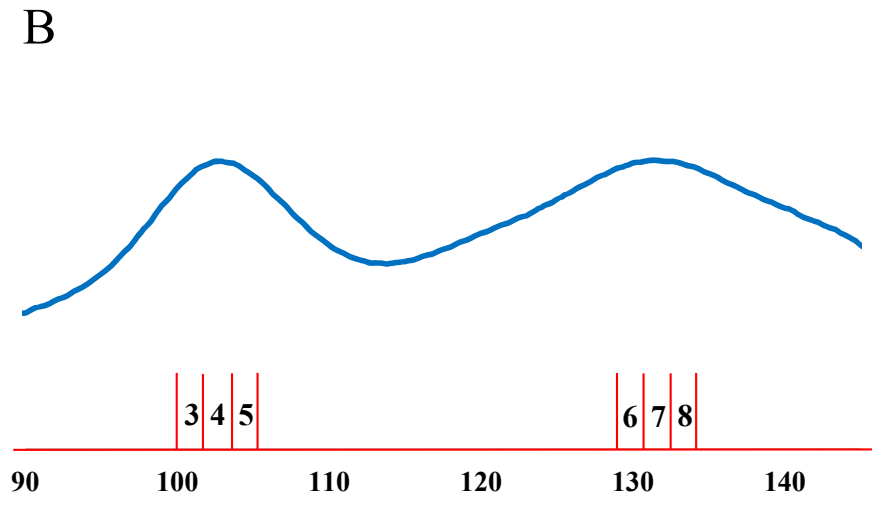
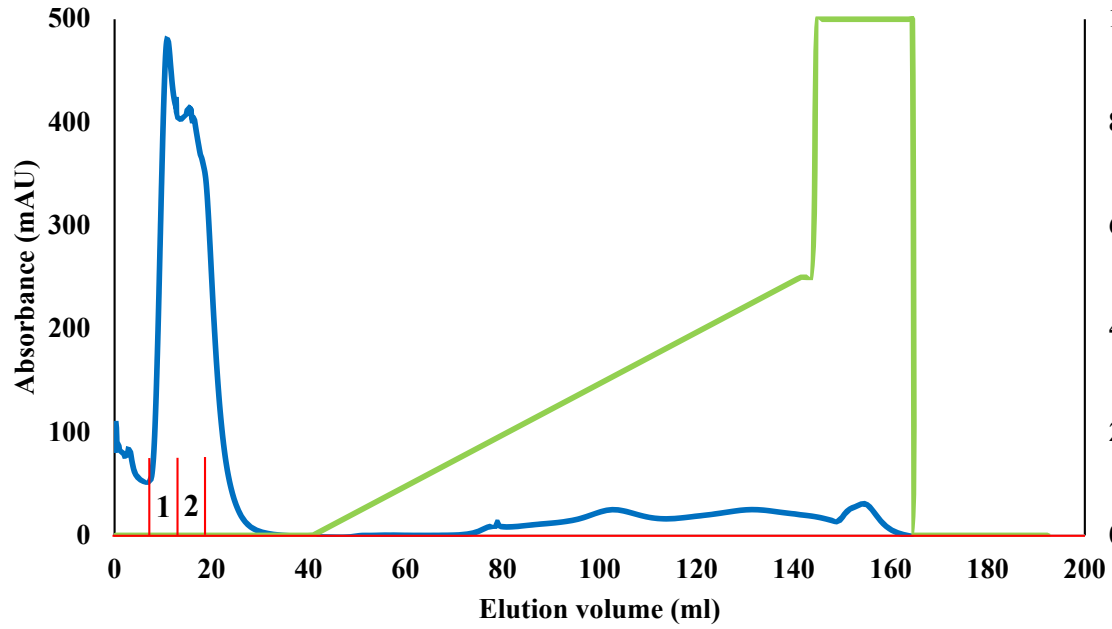
pMalc2x vector を基に改変したベクターに VASH1(56-310 aa) と全長 SVBP(2-66 aa) を組み込み、発現コンストラクト(CSB_P_255)を作製した。精製タグとして MBP と 6 つの連続した Histidine (MBP-his6) を N 末端側に付与した。精製タグと VASH1、SVBP の配列間に TEV protease 切断配列(tev)を挿入した。

(E) MBP-VASH1/SVBP の発現と可溶性の評価

10 ml の LB 液体培地中で発現プラスミド CSB_P_255 を形質転換した One shot BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) を発現誘導後、37 度で一晩培養した。培養後の菌液を 500 μ l 回収し、超音波破碎をして、可溶性検証した。M が分子量マーカー、U が発現誘導前、I が発現誘導後、P が沈殿画分、S が可溶性画分を示している。

A**B****C**

A Cation-exchange chromatography



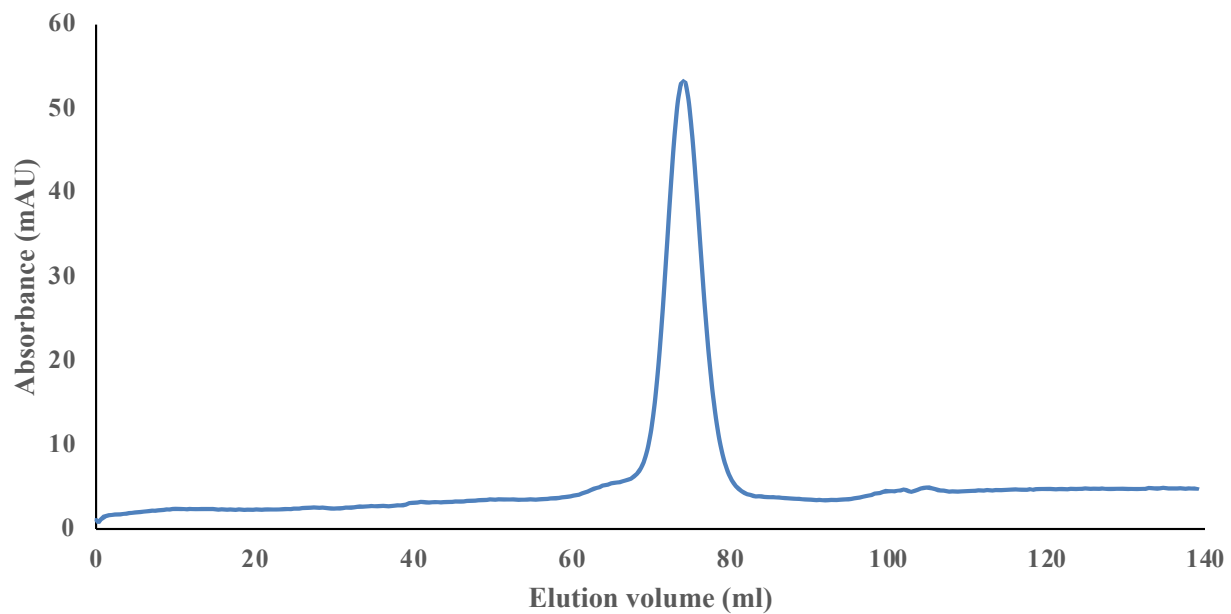
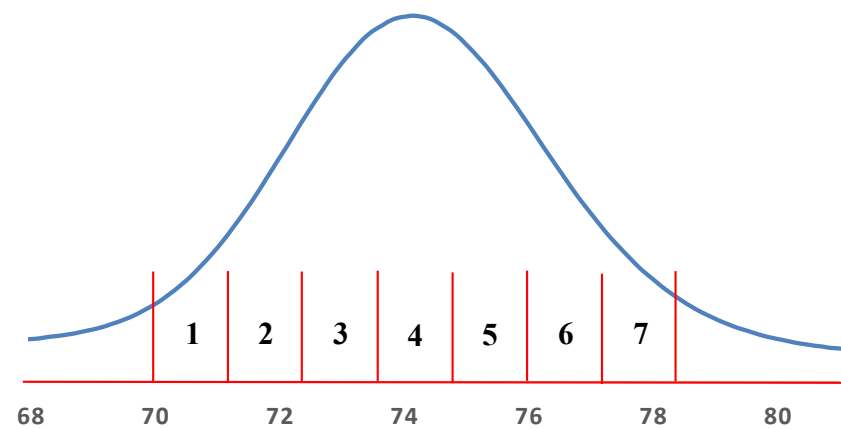
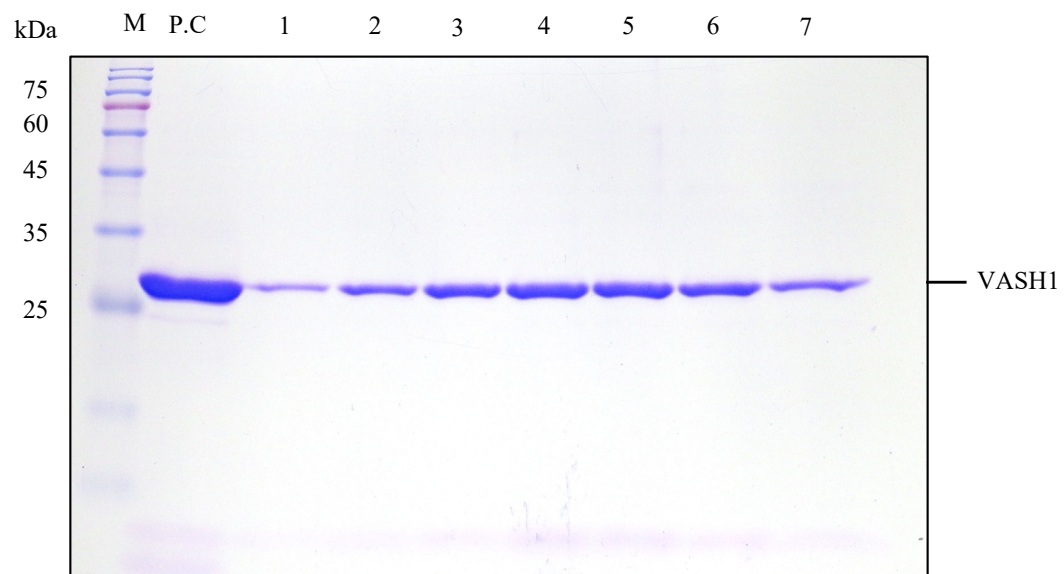
G**Gel filtration****H****I**

図 2. VASH1/SVBP の発現と精製

(A) - (C) Histidine-tag を利用したアフィニティー精製

可溶化した発現タンパク質をはじめに Histidine タグを用いたアフィニティー精製により回収した。

- (A) Histidine タグによるアフィニティー精製のクロマトグラフを示した。横軸が溶出量、縦軸が 280 nm での吸光度、青線で各溶出量における吸光度を示した。赤線で示した溶出画分を採取し、SDS-PAGE でタンパク質を検出した。
- (B) (A)のクロマトグラフの溶出量 250 ml 前後のピークを拡大して示した。
- (C) (A)と(B)の赤線で示した溶出画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で検出した。M のレーンが分子量マーカ、P.C が最終産物である VASH1、1-12 が各溶出画分に対応している。なお、SVBP は SDS-PAGE の前処理により VASH1 との複合体形成が解かれている。

(D) - (F) 陽イオン交換カラムによる精製

アフィニティー精製産物の精製タグを切断した後、陽イオン交換カラムを用いて VASH1/SVBP を回収した。

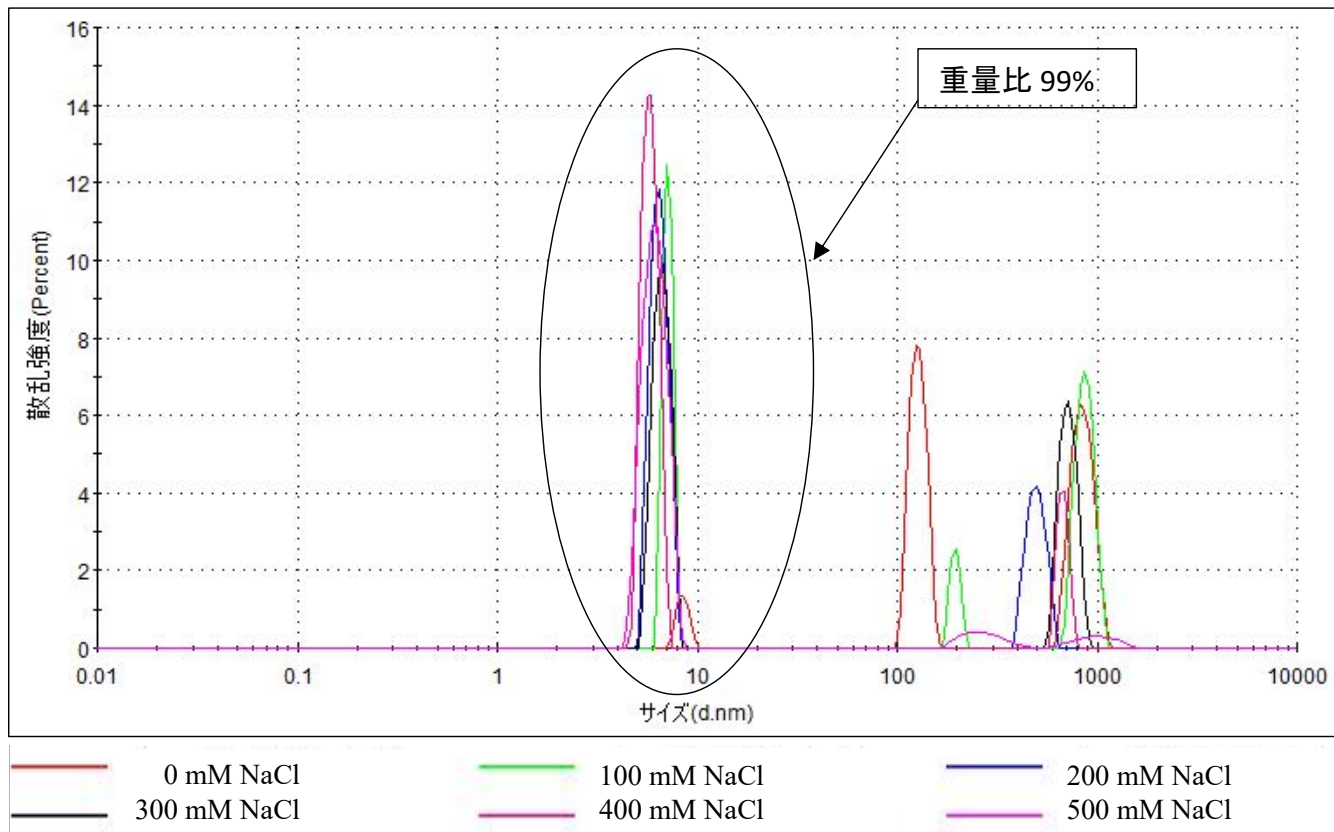
- (D) 陽イオン交換用 SP Sepharose HP カラム(GE Healthcare)を用いた精製のクロマトグラフを示した。横軸が溶出量、縦軸が 280 nm での吸光度、青線で各溶出量における吸光度、緑線で溶出用バッファー BufferA1000 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl)の混入率を示した。赤線で示した溶出画分を採取し、SDS-PAGE でタンパク質を検出した。
- (E) (D)のクロマトグラフの溶出量 100 ml と 130 ml 前後のピークを拡大して示した。
- (F) (D)と(E)の赤線で示した溶出画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で検出した。M のレーンには分子量マーカ、P.C が最終産物である VASH1 を流した。隣の二つのレーンには Histidine タグによるアフィニティー精製産物と TEV protease 処理をした精製タグ切断産物を流した。1-8 が各溶出画分に対応している。なお、SVBP は SDS-PAGE の前処理により VASH1 との複合体形成が解かれている。

(G) - (I) ゲル濾過カラムによる精製

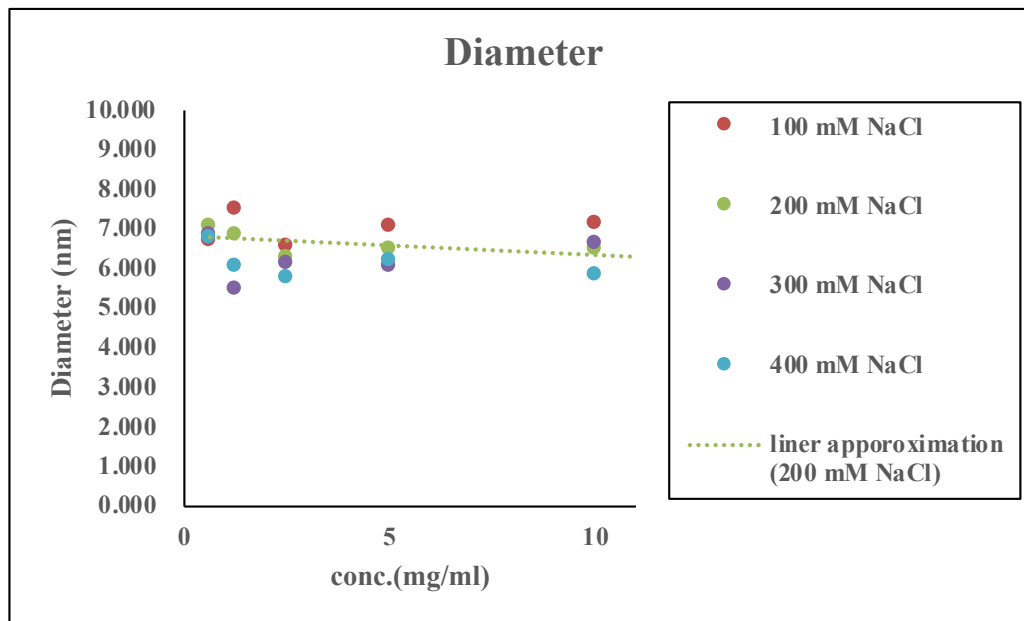
最後にゲル濾過カラムを用いて VASH1/SVBP 複合体を単離した。

- (G) ゲル濾過カラムを用いた精製のクロマトグラフを示した。
- (H) (D)のクロマトグラフの溶出量 75 ml 前後のピークを拡大して示した。
- (I) M のレーンが分子量マーカ、P.C が最終産物である VASH1、1-7 が各溶出画分に対応している。

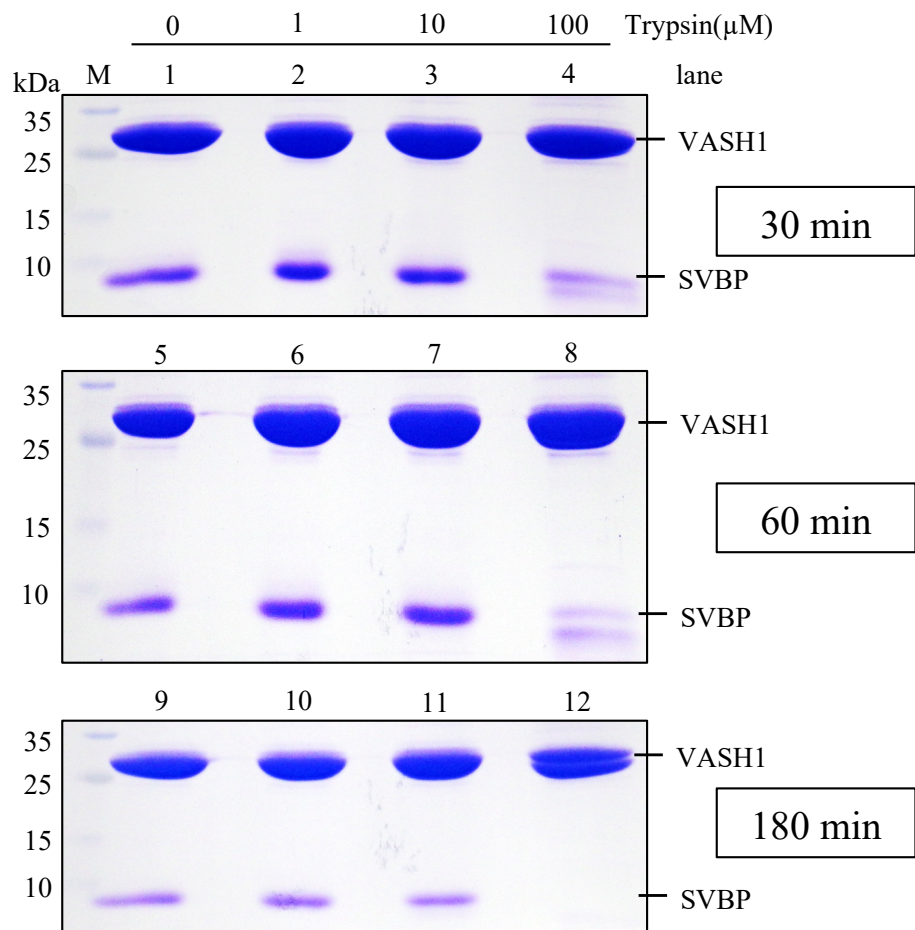
A



B



C



D

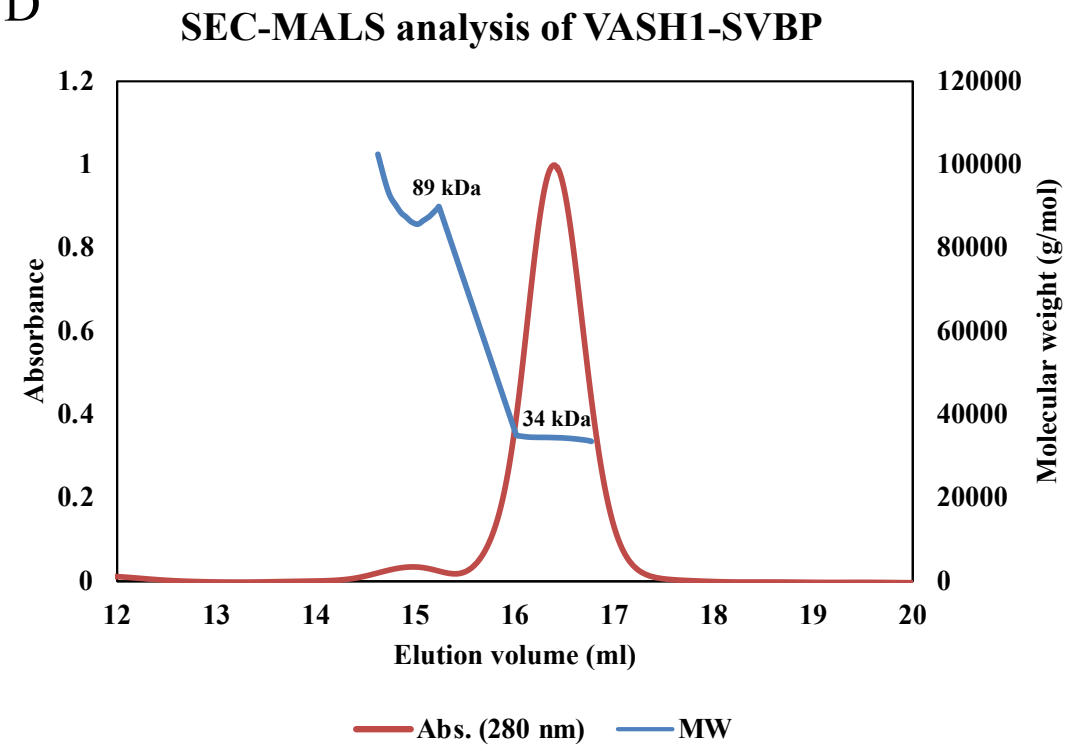


図 3. 結晶化に向けたタンパク質の性質評価

(A) 動的光散乱(DLS)による分子構造の均一性(分散度)の評価

精製した VASH1/SVBP 複合体の性質を評価するために、DLS により溶液中の会合状態を解析した。塩濃度 0 mM から 500 mM まで 100 mM 毎の希釈系列を作製し、DLS 解析を行った。グラフは横軸（対数目盛り）に粒子の直径（サイズ）、縦軸に溶液全体の占める各粒子径での散乱強度を示した。サイズが大きいほど散乱強度が大きくなるが、黒い円で囲ったピークが各溶液中で重量比 99%以上を占めていた。

(B) VASH1/SVBP 複合体タンパク質溶液のタンパク質濃度（および塩濃度）の希釈系列と分子直径の関係

タンパク質濃度と塩濃度による粒子径および会合状態への影響を比較した。その際、塩濃度希釈系列のうち 100, 200, 300, 400 mM の VASH1/SVBP 溶液それぞれに対してタンパク質濃度の異なる 5 つの希釈系列（0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml）計 20 種類の条件を解析した。グラフの横軸はタンパク質濃度、縦軸は粒子径を示した。赤、緑、紫、青の丸でタンパク質濃度における塩濃度 100, 200, 300, 400 mM 条件下での粒子径を示した。点線は最も平均的な粒子径が測定された塩濃度 200 mM 条件下でのタンパク質濃度に依存した近似曲線を示している。

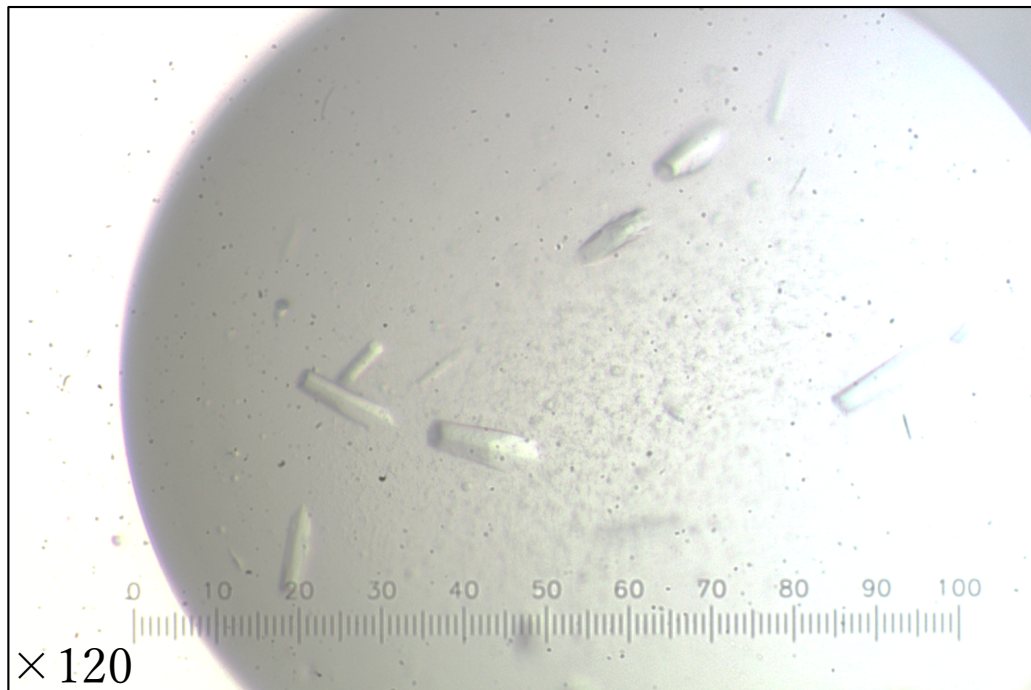
(C) トリプシン限定分解(TLP)によるドメイン構造の安定性の評価

トリプシン分解酵素を用いて VASH1/SVBP 複合体の堅牢な構造を取らない領域（天然変性領域）を切断し、VASH1/SVBP 複合体の安定性と最小のドメイン構造を検証した。トリプシン濃度の希釈系列を 0, 1, 10, 100 μ M を作製し、タンパク質濃度 2 mg/ml の VASH1/SVBP 複合体溶液に対して限定分解反応を行なった。

(D) サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱法(SEC-MALS)による溶液中での多量体形成の解析

VASH1/SVBP 複合体の溶液中での多量体形成状態を SEC-MALS によって解析した。赤褐色の線で 280 nm での吸光度、青色の線で各ピークでの分子量を示した。

A



B

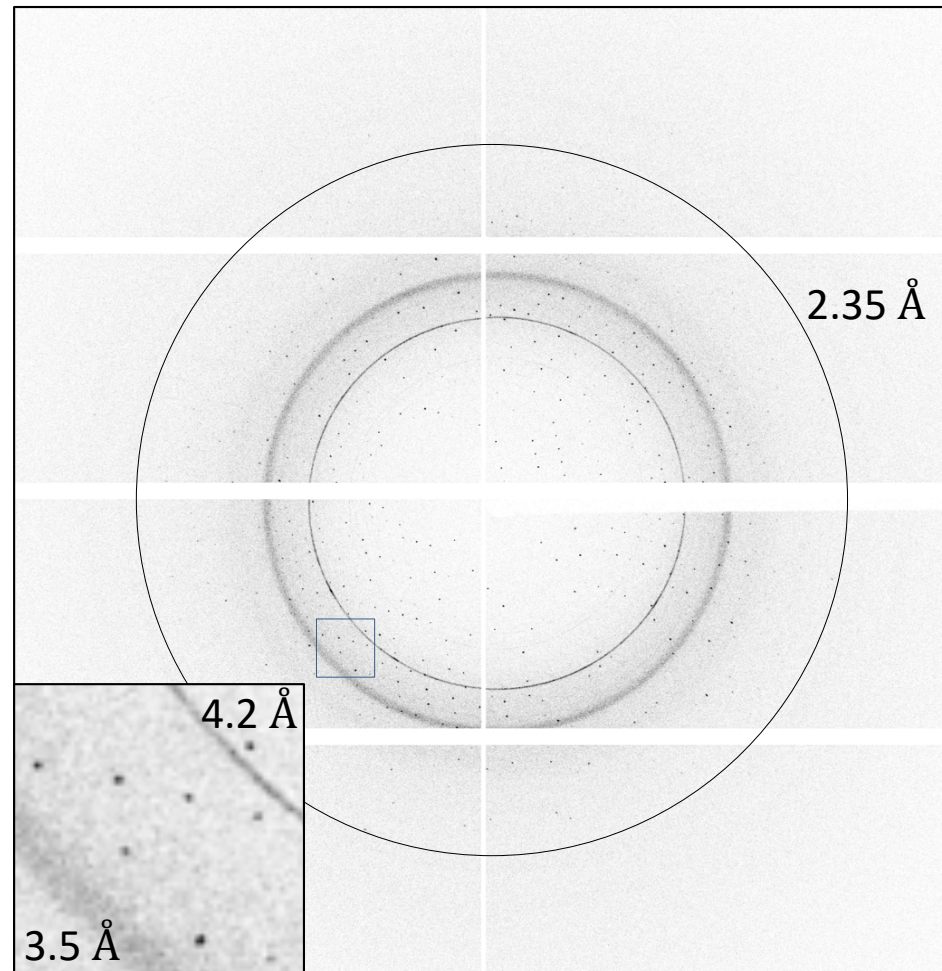


図 4. VASH1/SVBP 複合体の結晶と X 線回折像

(A) VASH1/SVBP 複合体の結晶

VASH1/SVBP 複合体を 0.16 M 硫酸アンモニウム, 0.08 M 酢酸ナトリウム pH 4.6, 20% (w/v) PEG4000, 20% (v/v) グリセロールの溶液条件下で 20°C、数ヶ月間静置した後、観察された六角柱状の結晶を示した。光学顕微鏡を用いて 120 倍に拡大して観察した。

(B) VASH1/SVBP 複合体の結晶の X 線回折像

作製した VASH1/SVBP 複合体の結晶に X 線を照射し最大分解能 2.3 Å の回折像を得た。左下に回折像の一部の拡大図を示した。

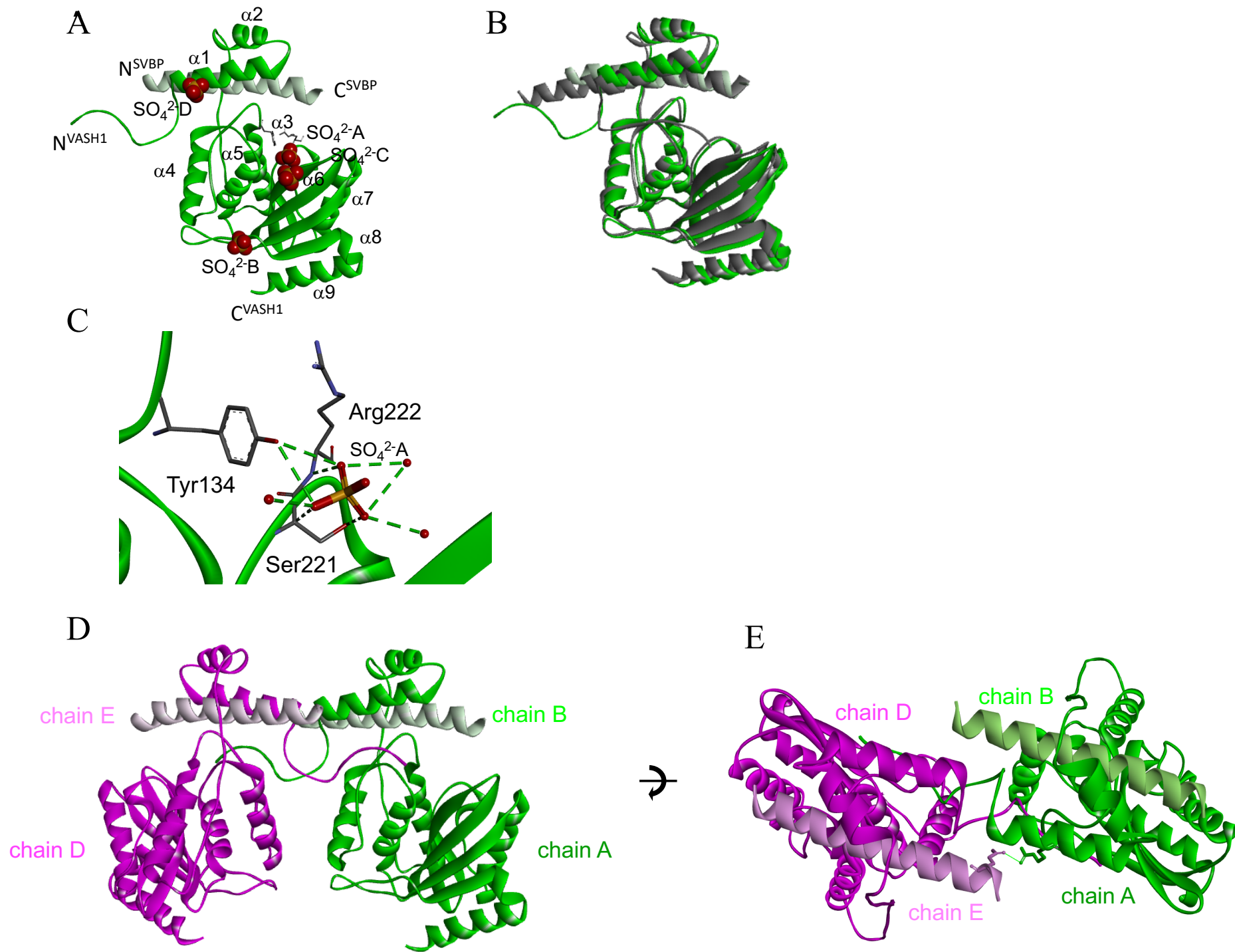


図 5. VASH1/SVBP 複合体の結晶構造

(A) VASH1/SVBP ヘテロ二量体(6LPG)

VASH1 を緑、SVBP を薄緑で示した。VASH1/SVBP に配位する 4 つの硫酸イオンは球体モデルで示した ($\text{SO}_4^{2-}\text{A}\sim\text{D}$)。VASH1 の 9 つの α ヘリックス は N 末端側から順に番号をつけた($\alpha 1\sim 9$)。VASH1 の N 末端から $\alpha 1$ が始まるの手前までのアミノ酸が N 末端領域(56-69 aa)に該当する。

(B) VASH1/SVBP ヘテロ二量体の重ね合わせ(6LPG, 6J7B)

得られた VASH1/SVBP 複合体の結晶構造(6LPG)と他研究グループから報告された結晶構造(表 3 参照)のうち最も N 末端側のアミノ酸残基が長く観察されていた構造(6J7B、灰色)を重ね合わせた。立体構造の大部分が重なっているが、N 末端側のループ領域のみ方向性が異なっていた。

(C) VASH1/SVBP の活性付近に配位している硫酸イオン

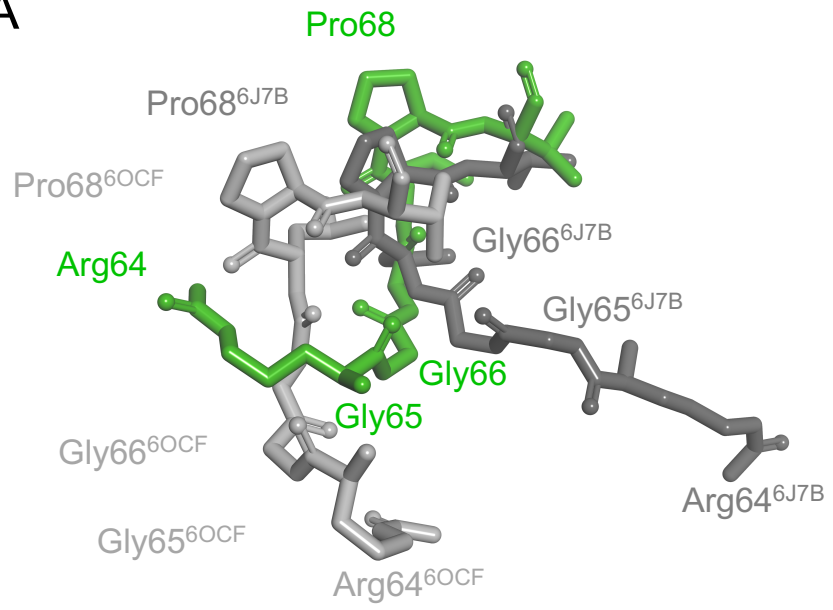
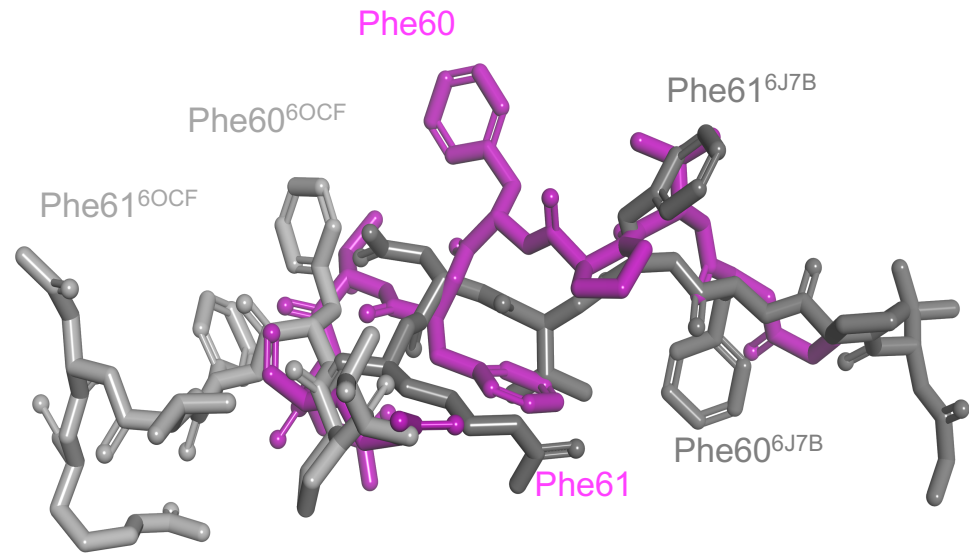
硫酸イオンの一つ(SO_4^{2-}A)が活性中心近傍に位置し、3 つのアミノ酸残基 (Tyr134, Ser221, and Arg222)と接触していた。硫酸イオンは棒モデル、水分子は赤球で示した。

(D) VASH1/SVBP ヘテロ四量体

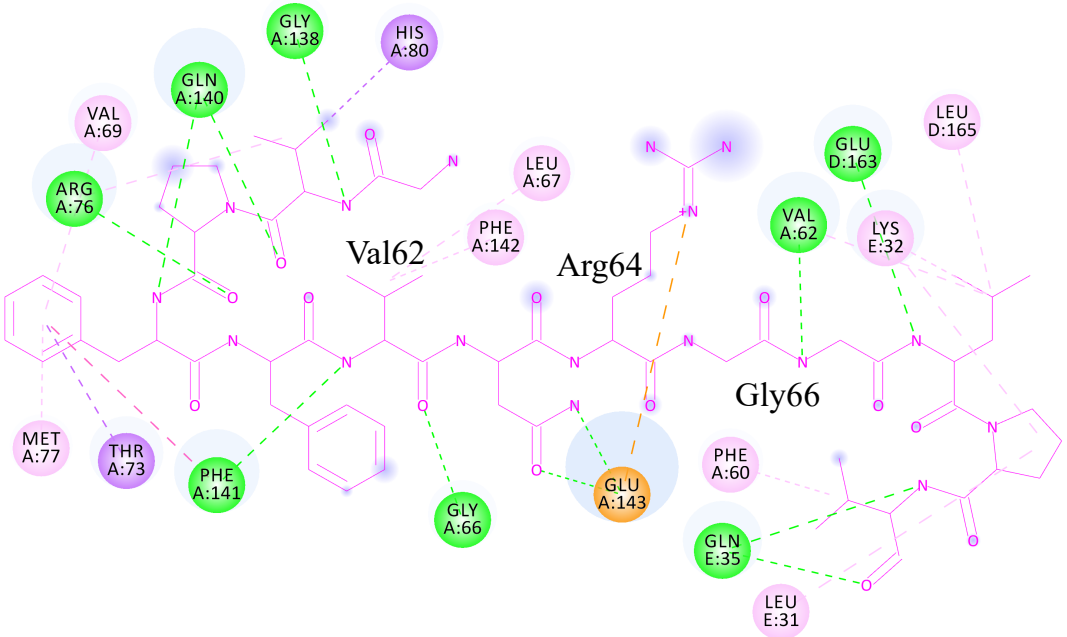
得られた結晶構造から、隣接する二回転対称分子間で形成された VASH1/SVBP ヘテロ四量体をリボン図で示した。VASH1 を A 鎖と D 鎖 (緑と紫紅)、SVBP を B 鎖と E 鎖 (薄緑と薄桃) と表記した。

(E) VASH1/SVBP ヘテロ四量体 ((D) を手前に 90° 回転させた状態)

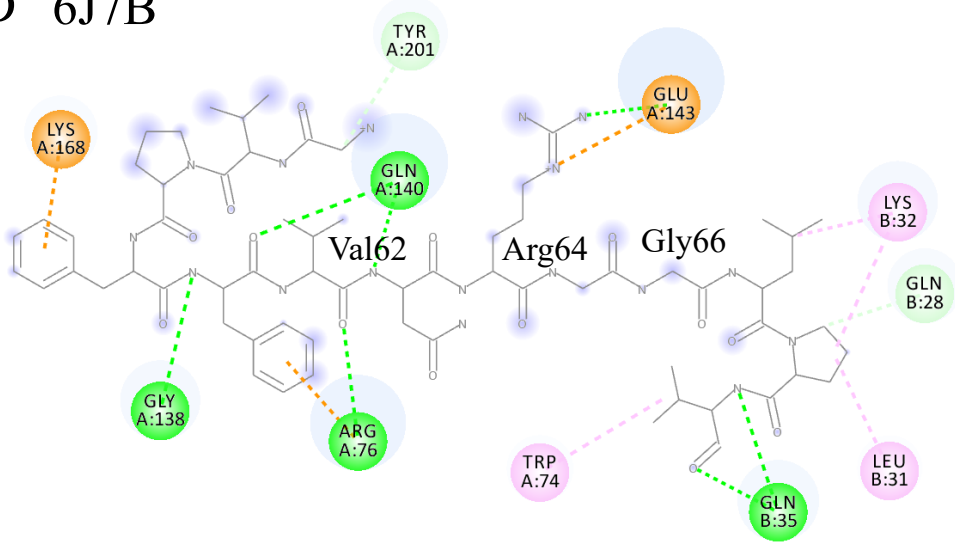
対称分子間で接近している VASH1 の Arg76 (A 鎖) の側鎖 と SVBP の Glu28 (E 鎖) の側鎖間で形成された水素結合を棒モデルで表記した。

A**B**

C Heterotetramer



D 6J7B



E 6OCF

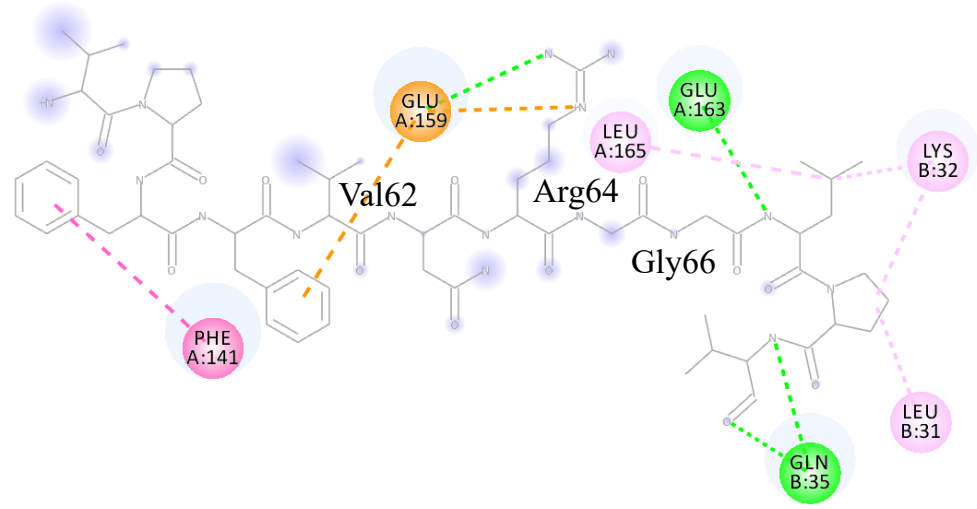


図 6. VASH1/SVBP ヘテロ四量体の N 末端領域構造(56-69)の比較

N 末端領域の構造を比較し、分子内および分子間相互作用を二次元表記で示した。N 末端領域と相互作用するアミノ酸を鎖 (VASH1:A と D、SVBP:B と E) と残基番号の書かれた円で示した。円と点線の色はそれぞれ、電荷相互作用 (オレンジ)、水素結合 (緑)、 π -シグマ相互作用 (紫)、 π - π T 字型相互作用 (紫紅)、アルキル/ π -アルキル相互作用 (桃)、の相互作用を示した。原子とアミノ酸残基の青い影の大きさは、溶媒露出面積の程度に対応している。

(A) N 末端領域ターン構造(65-69)の比較

VASH1 の N 末端領域 (Arg64-Pro68) の拡大図を棒モデルで示した。ヘテロ四量体 (A 鎖) を緑、6J7B を灰色、6OCF を薄灰色で示した。

(B) N 末端領域ループ構造(56-64)の比較

VASH1 の N 末端領域 (Gly57-Arg64) の拡大図を棒モデルで示した。ヘテロ四量体 (D 鎖) を紫紅色、6J7B を灰色、6OCF を薄灰色で示した。

(C) VASH1/SVBP ヘテロ四量体(6LPG) の N 末端領域構造(56-69)の相互作用

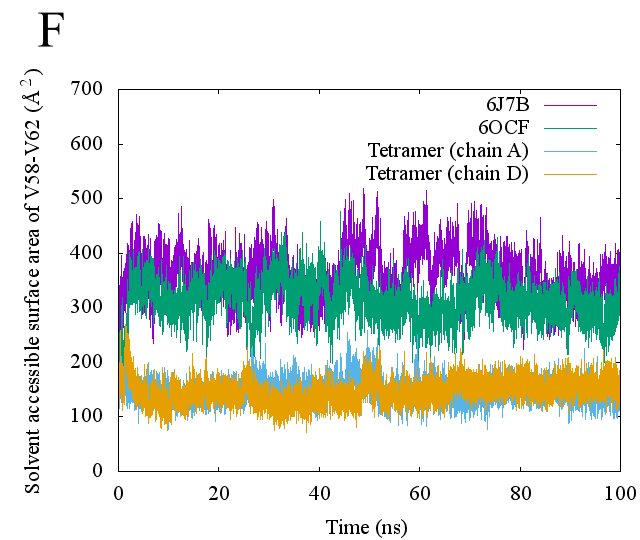
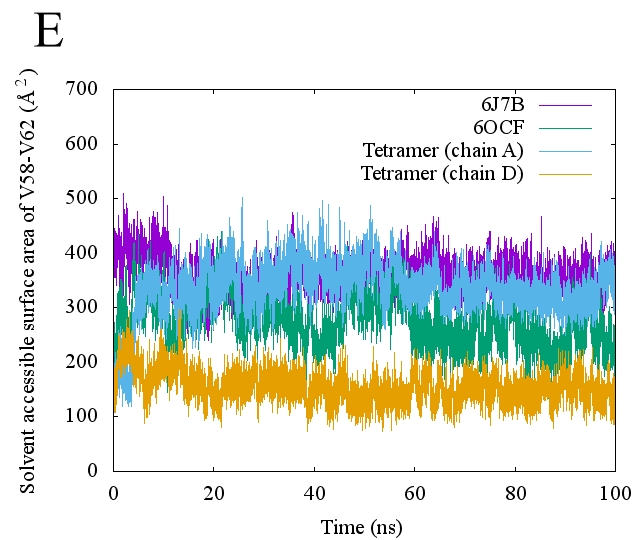
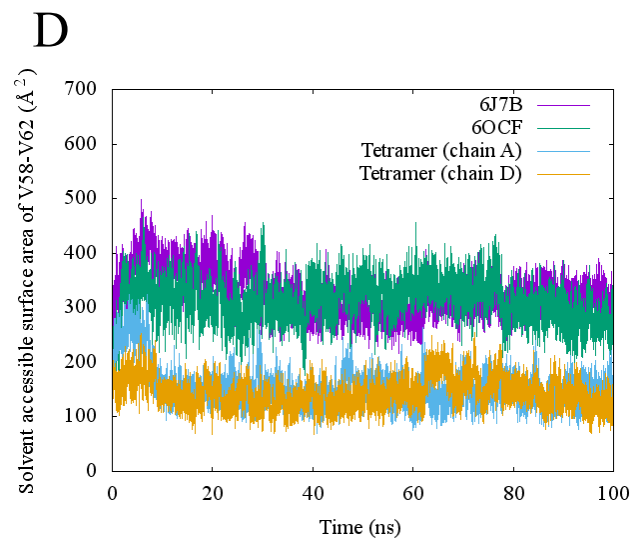
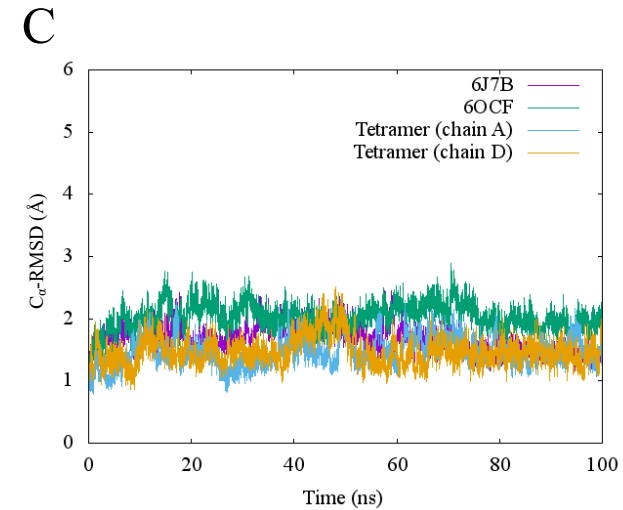
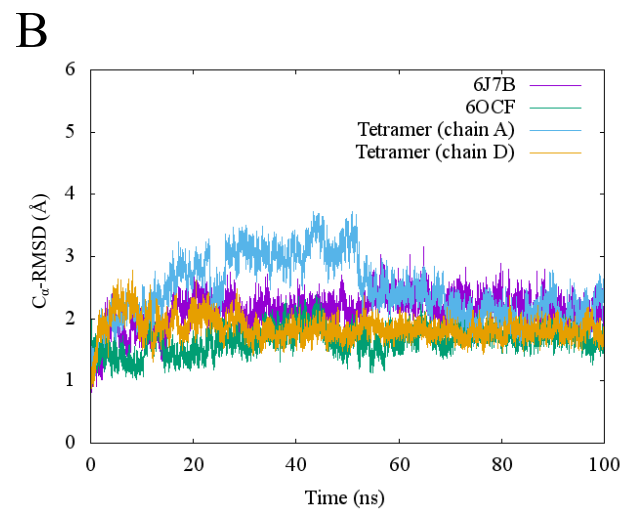
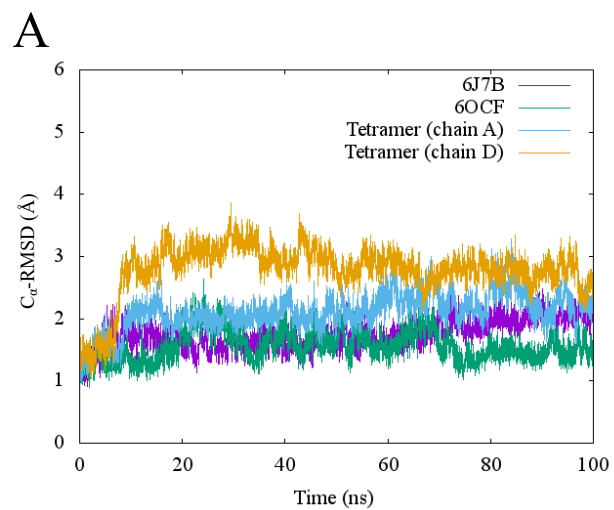
VASH1 (D 鎖) を紫紅色の構造式で示した。相互作用しているアミノ酸の識別鎖 A と D は VASH1、E は SVBP を示している。

(D) VASH1/SVBP ヘテロ二量体(6J7B) の N 末端領域構造(57-69)の相互作用

VASH1 (6J7B) を灰色の構造式で示した。相互作用しているアミノ酸の識別鎖 B は SVBP を示している。

(E) VASH1/SVBP ヘテロ二量体(6OCF) の N 末端領域構造(58-69)の相互作用

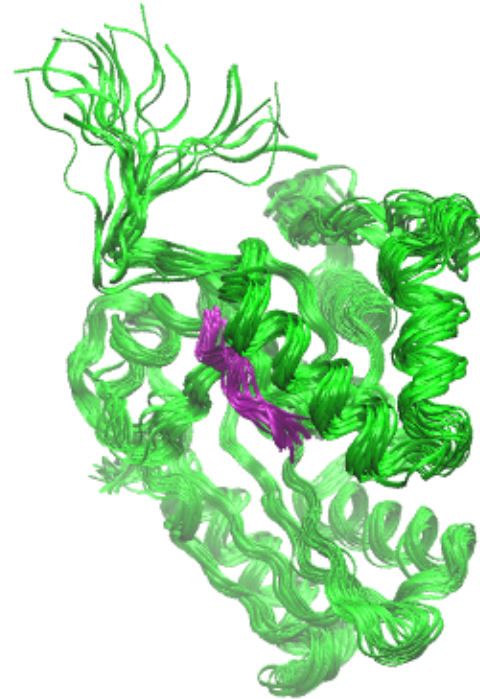
VASH1 (6OCF) を薄灰色の構造式で示した。相互作用しているアミノ酸の識別鎖 B は SVBP を示している。



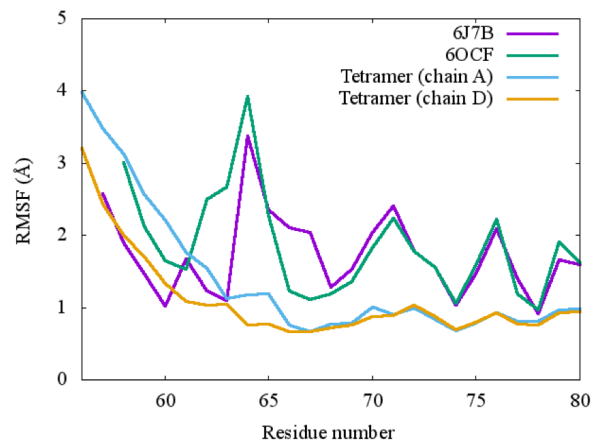
G



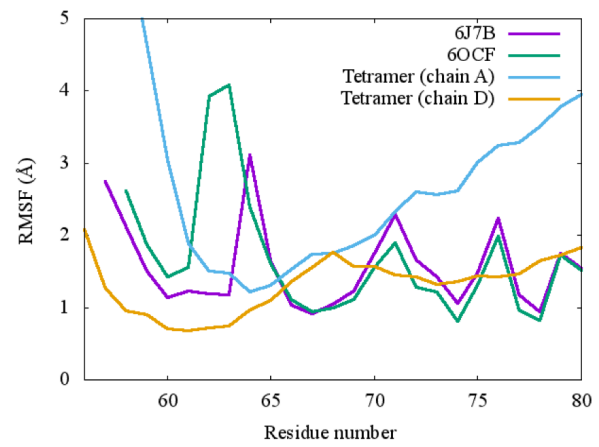
H



I



J



K

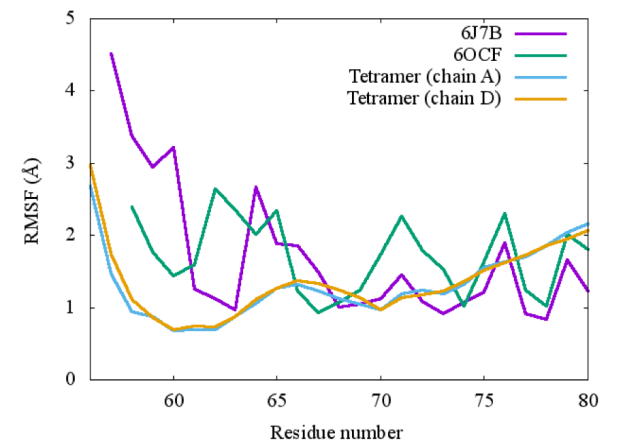


図 7. VASH1/SVBP ヘテロ四量体の全原子分子動力学(MD)シミュレーション

VASH1/SVBP 複合体 (ヘテロ四量体(6LPG)、ヘテロ二量体(6J7B, 6OCF)の3つの結晶構造)を基に計3回の独立した100 ns の MD シミュレーションを行った。各シミュレーション時の全体構造の挙動と Val58-Val62 の溶媒露出表面積の変化、Gly56-His80 までのアミノ酸残基の揺動性を解析した (1回目: 7A, 7D, 7I、2回目: 7B, 7E, 7J、3回目: 7C, 7F, 7K)。また、2回目の MD シミュレーションにおいて、ヘテロ四量体の N 末端領域での大きな揺動がみられた (7G, 7H)。

各グラフではヘテロ四量体の A 鎖を緑色、D 鎖を橙色、ヘテロ二量体である 6J7B を紫色、ヘテロ二量体である 6OCF を水色で示した。

(A)-(C) 各モデル構造の RMSD 値(1回目から3回目の MD シミュレーション)

横軸にシミュレーション時間、縦軸に主鎖 C α の RMSD 値をとり、各構造に対応する色の線で時間変化に伴う RMSD 値を示した。1回目から3回目の各 100 ns の MD シミュレーションは独立して行なった。

(D)-(F) 各モデル構造の VPFV58-62 の溶媒露出表面積 (SASA) (1回目から3回目の MD シミュレーション)

横軸にシミュレーション時間、縦軸に VPFV58-62 の溶媒露出表面積 (SASA) をとり、各構造に対応する色の線で時間変化に伴う SASA 値を示した。1回目から3回目の各 100 ns の MD シミュレーションは独立して行なった。

(G)-(H) VASH1/SVBP ヘテロ四量体の N 末端領域(A 鎖)の揺動性 (2回目の MD シミュレーション時)

2回目の 100 ns MD シミュレーション時のヘテロ四量体を重ね合わせて、N 末端領域の構造変化を示した。ヘテロ四量体の A 鎖は緑色、D 鎖は紫紅色で表記した。

(G) D 鎖 (紫紅色) と A 鎖 (緑色) の N 末端領域を示した。

(H) A 鎖 (緑色) と D 鎖 (紫紅色) の N 末端領域を示した。

(I)-(K) 各モデル構造の N 末端側のアミノ酸(56-80 aa)の C α 原子の RMSF 値 (1回目から3回目の MD シミュレーション)

横軸にシミュレーション時間、縦軸に主鎖 C α の RMSF 値をとり、各構造に対応する色の線で時間変化に伴う RMSF 値を示した。1回目から3回目の各 100 ns の MD シミュレーションは独立して行なった。

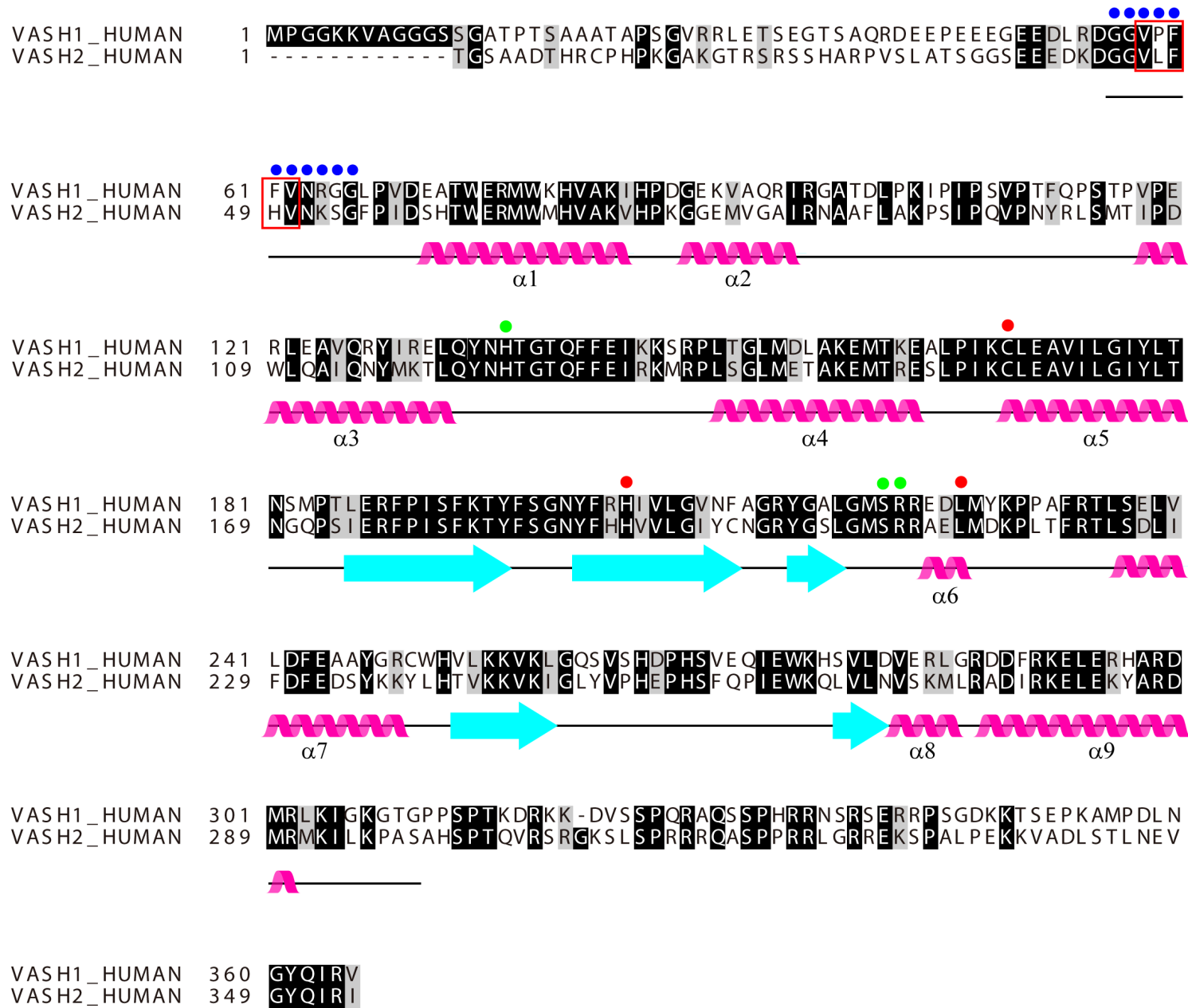


図 8. VASH1 と VASH2 のアミノ酸配列アラインメント

CLASTALW を用いてヒト VASH1 と VASH2 の配列アラインメントを行い、BOXSHADE を用いて配列相同性に応じたハイライトを加えた。活性中心のアミノ酸を赤、活性中心近傍に位置する硫酸イオン(SO₄²⁻A)を緑、N 末端領域の一部(Gly56-Gly66)を青の丸印で示した。N 末端領域の連続した疎水性アミノ酸残基 VPFFV (VASH2 では VLFHV にあたる)を赤枠で囲った。αヘリックスは紫紅色の模式図(螺旋)、βシートは水色の模式図(矢印)で示した。

表 1. VASH1/SVBP と基質の発現コンストラクト

Plasmid No.	Plasmid Name	Expression	Soluble	Tag cleavage
CSB_P_0248	pMalht5HsVash1core	+	-	N.D
CSB_P_0249	pMalt5hHsVash1core	+	-	N.D
CSB_P_0250	pMalht5HsSVBP	-	N.D	N.D
CSB_P_0251	pMalt5hHsSVBP	-	N.D	N.D
CSB_P_0254	pMalht5HsVASH1core-HsSVBP	++	+	+
CSB_P_0255	pMalht5HsVASH1core(tev2)HsSVBP	++	+	+
CSB_P_0256	pMalht5HsVASH1core(tev4)HsSVBP	++	+	+
CSB_P_0257	pMalht5HsVash1	-	N.D	N.D
CSB_P_0267	pRSFHSHsVASH1core(tev4)HsSVBP	+	N.D	N.D
CSB_P_0268	pMalht5HsVASH1coreC169A-HsSVBP	+	N.D	N.D
CSB_P_0270	pMalht5HsVASH1coreC169A(tev2)HsSVBP	+	+	+
CSB_P_0271	pMalht5HsVASH1coreC169A(tev4)HsSVBP	+	+	+
CSB_P_0368	pGEX6P1TUBAwt	++	+	+
CSB_P_0369	pGEX6P1TUBAmt	++	+	+
CSB_P_0392	pMalhtTUBAwt	+++	+	+
CSB_P_0393	pMalhtTUBAmt	+++	+	+
CSB_P_0488	pMalhtTUBAΔY	+++	+	+
CSB_P_0489	pGEX6P1TUBAΔY	++	+	+
CSB_P_0499	pMalhtHsVash1coreG57C(tev4)HsSVBP	+	+	+
CSB_P_0500	pMalht5HsVash1core(del56-64)(tev4)HsSVBP	+	+	+
CSB_P_0507	pMalht5HsVash1coreG138C(tev4)HsSVBP	+	+	+

表 2. X 線回折データと精密化

VASH1/SVBP (PDB ID = 6LPG)	
Wavelength	1
Resolution range	47.06 - 2.3 (2.382 - 2.3)
Space group	P 61 2 2
Unit cell	71.854 71.854 215.811 90 90 120
Total reflections	30976 (2984)
Unique reflections	15488 (1492)
Multiplicity	2.0 (2.0)
Completeness (%)	99.89 (100.00)
Mean I/sigma(I)	24.05 (2.59)
Wilson B-factor	48.41
R-merge	0.01637 (0.2435)
R-meas	0.02315 (0.3443)
R-pim	0.01637 (0.2435)
CC1/2	1 (0.86)
CC*	1 (0.962)
Reflections used in refinement	15474 (1492)
Reflections used for R-free	1548 (149)
R-work	0.1902 (0.2345)
R-free	0.2351 (0.2969)
CC(work)	0.956 (0.872)
CC(free)	0.875 (0.741)
Number of non-hydrogen atoms	2358
macromolecules	2262
ligands	20
solvent	76
Protein residues	277
RMS(bonds)	0.007
RMS(angles)	0.85
Ramachandran favored (%)	96.7
Ramachandran allowed (%)	3.3
Ramachandran outliers (%)	0
Rotamer outliers (%)	2.88
Clashscore	5.7
Average B-factor	60.8
macromolecules	60.56
ligands	96.62
solvent	58.55
Number of TLS groups	10

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

表 3. 既報告 VASH1/SVBP 結晶構造

Authors	PDB ID	Entry name	VASH expression region (aa)	Electron density visible region (aa)	SVBP expression region (aa)	annotation
Li et al., 2019	6OCF	SeMet VASH1–SVBP		58-305		
	6OCG	VASH1–SVBP–epoY	52-310	59-305	1-66	BL21(DE3)
	6OCH	VASH1–SVBP–parthenolide		61-302		
Adamopoulos et al., 2019	6NVQ	VASH1–SVBP(C169A)	1-315	61-304	1-66	Sf9 insect cell SAD
Wang et al., 2019	6J4O	SeMet V2c–SVBP	46-296	49-294		
	6J4P	V2c–SVBP–epoY	46-296	48-293		
	6J4Q	V2c–SVBP–TPCK	46-296	49-295		
	6J4V	V2c–SVBP–mtTail	46-296	49-294	1-66	BL21(DE3)-RIL
	6J4S	V2–SVBP	1-355	49-298		
	6J4U	V1c–SVBP	57-306	61-307		
Zhou et al., 2019	6QBY	V2c–SVBP	46-296	48-292		
	6JZC	V2–SVBP		49-299		Sf9 insect cell
	6JZD	V2–SVBP(C158A)	1-355	49-299	1-66	I3C SAD
	6JZE	V2c–SVBP		48-301		
Liao et al., 2019	6J9I	SeMet V1c–SVBP	70-306	70-303	1-66	BL21(DE3)
	6J9H	V1c–SVBP	70-306	69-303		Apo
	6J8N	V1c–SVBP (C169A)	70-306	69-303		
	6J8F	V1c–SVBP - GEEGECY	70-306	70-303	3-49	
	6J7B	V1c–SVBP - epoY	57-306	57-305	1-52	
Liu et al., 2019	6K8I	V1c–SVBP	44-315	60-304	1-66(25-53)	Rosetta, SAD
Li et al., 2020	6WSL	V1c–SVBP-GTP,*G2P	52-310	58-305	1-66	BL21(DE3)
	EMD-21893	V1c–SVBP-MT	52-310	-	1-66	BL21(DE3)

*Phosphomethylphosphonic acidguanylate ester

表 4. N 末端領域(59-71)の主鎖二面角の解析

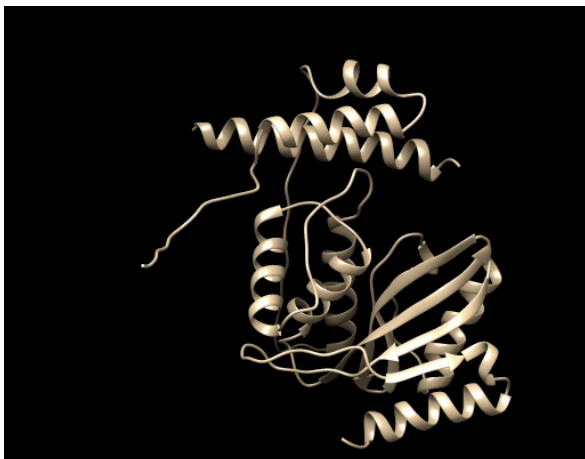
No.	Residue		Tetramer		6J7B		6OCF	
	name	type	ϕ (°)	ψ (°)	ϕ (°)	ψ (°)	ϕ (°)	ψ (°)
59	PRO	trans-Pro	-67.64	131.47	-73.86	151.81	-63.45	148.77
60	PHE	General	-152.24	55.26	-145.14	161.15	-59.22	-35.06
61	PHE	General	-81.68	87.02	-92.34	152.62	-105.38	65.67
62	VAL	Ile/Val	-63.70	-19.60	-125.30	132.36	-69.27	-60.18
63	ASN	General	-87.43	-0.80	-74.72	113.22	-41.42	85.62
64	ARG	General	-91.08	127.14	-107.00	8.33	-54.75	174.09
65	GLY	Gly	-80.74	-166.86	-120.12	23.28	79.26	-146.24
66	GLY	Gly	94.78	159.68	75.01	-171.14	-129.36	-142.16
67	LEU	pre-Pro	-57.58	152.78	-116.39	144.07	-69.55	153.65
68	PRO	cis-Pro	-76.18	152.65	-63.54	153.50	-83.35	153.61
69	VAL	Ile/Val	-99.93	161.22	-61.19	130.19	-86.70	167.07
70	ASP	General	-68.75	165.91	-66.13	157.87	-74.83	167.19
71	GLU	General	-72.44	-26.88	-55.91	-43.05	-63.08	-44.52

表 5. PDBePISA を用いた N 末端領域構造(56-67)の解析

Structure	N-terminal region	Interface area (\AA^2)	ΔG^a (kcal/mol)
Tetramer	56-67	551.5	-7.5
6J7B	57-67	659.9	-5.5
6OCF	58-67	540.0	-7.0

^a Solvation free energy gain upon formation of the interface

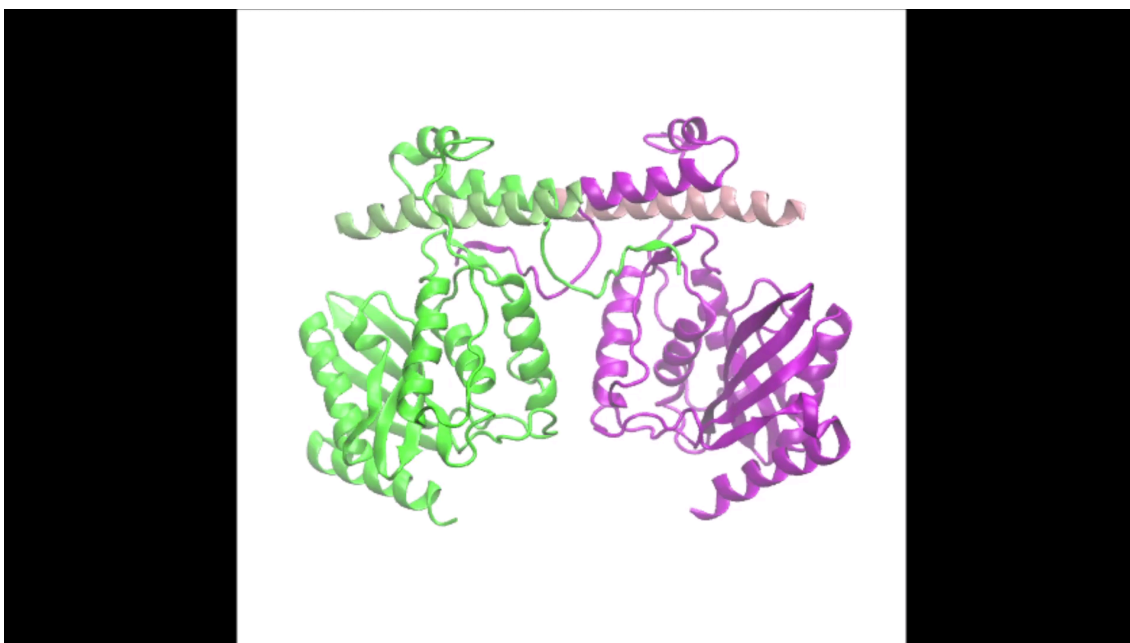
6LPG



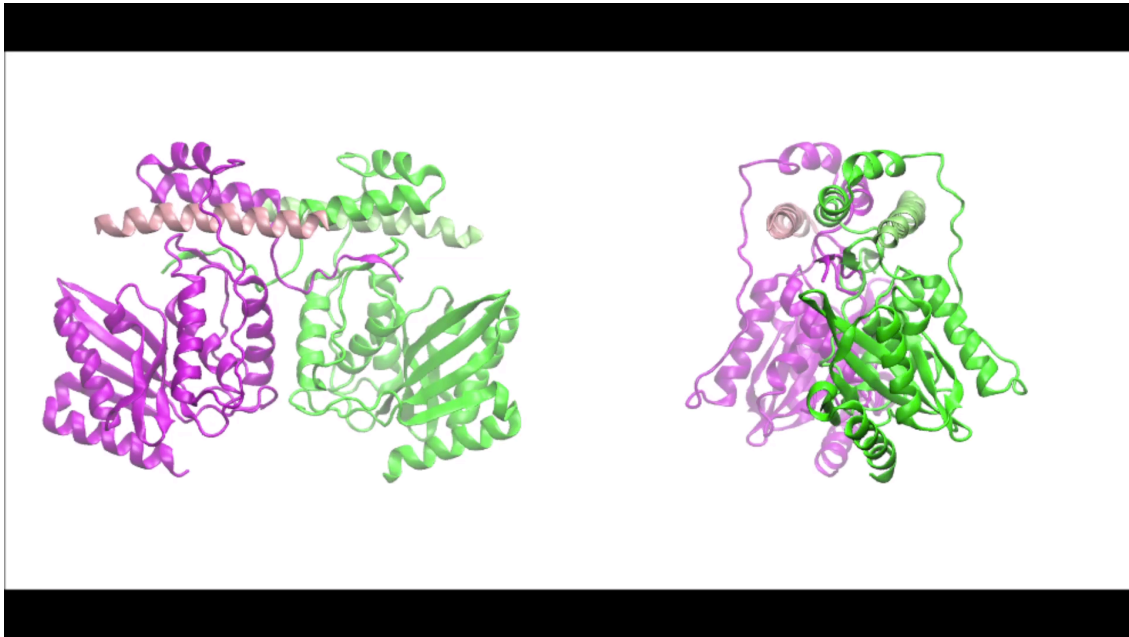
6J7B



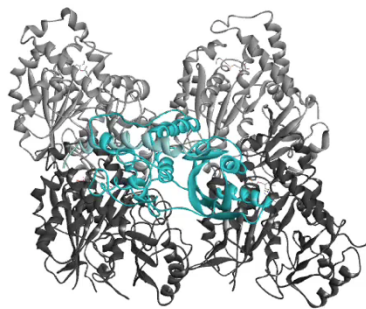
動画 1. 1 ns MD シミュレーションによる VASH1/SVBP ヘテロ二量体の N 末端領域の揺動性の比較



動画 2. VASH1/SVBP ヘテロ四量体の N 末端領域の揺動性 (2 回目の MD シミュレーション時)



動画 3. VASH1/SVBP ヘテロ四量体の回転運動



動画 4. 微小管結合時の VASH1/SVBP ヘテロ二量体への VASH1/SVBP ヘテロ四量体の重ね合わせ

第 6 章 参考文献

Adamopoulos, A., Landskron, L., Heidebrecht, T., Tsakou, F., Bleijerveld, O. B., Altelaar, M., Nieuwenhuis, J., Celie, P. H. N., Brummelkamp, T. R. & Perrakis, A. (2019). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 567–570.

Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Van Dijk, J., Le Friec, J., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L. E., Syed, S., Amara, N., Couté, Y., Lafanechère, L., Denarier, E., Delphin, C., Pelletier, L., Humbert, S., Bogyo, M., Andrieux, A., Rogowski, K. & Moutin, M.-J. (2017). *Science*. **358**, 1448–1453.

Arbing, M. A., Kaufmann, M., Phan, T., Chan, S., Cascio, D. & Eisenberg, D. (2010). *Protein Science*. **19**, 1692–1703.

BIOvIA, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. San Diego, Dassault Systemes, *Release*, 4

Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M. & Karplus, M. (2009). *Journal of Computational Chemistry*. **30**, 1545–1614.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. (1984). *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690.

Caldwell, R. A. (1992). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 43–46.

Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke & A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D.J. Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-

Ferrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York and P.A. Kollman (2018).

Dominy, B. N. & Brooks, C. L. (1999). *J. Phys. Chem. B.* **103**, 3765–3773.

Dunn, B. M. (2002). *Chem. Rev.* **102**, 4431–4458.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501.

Ghosh, E., Dwivedi, H., Baidya, M., Srivastava, A., Kumari, P., Stepniewski, T., Kim, H. R., Lee, M.-H., van Gastel, J., Chaturvedi, M., Roy, D., Pandey, S., Maharana, J., Guixà-González, R., Luttrell, L. M., Chung, K. Y., Dutta, S., Selent, J. & Shukla, A. K. (2019). *Cell Reports.* **28**, 3287-3299.e6.

Hedstrom, L., Lin, T.-Y. & Fast, W. (1996). *Biochemistry.* **35**, 4515–4523.

Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). *Journal of Molecular Graphics.* **14**, 33–38.

Jones, D. T. & Cozzetto, D. (2015). *Bioinformatics.* **31**, 857–863.

Kabsch, W. (2010). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**, 125–132.

Kadonosono, T., Yimchuen, W., Tsubaki, T., Shiozawa, T., Suzuki, Y., Kuchimaru, T., Sato, Y. & Kizaka-Kondoh, S. (2017). *Protein Sci.* **26**, 452–463.

Kobayashi, M., Wakabayashi, I., Suzuki, Y., Fujiwara, K., Nakayama, M., Watabe, T. & Sato, Y. (2020). *Angiogenesis.*

Li, F., Hu, Y., Qi, S., Luo, X. & Yu, H. (2019). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 583–591.

Li, F., Li, Y., Ye, X., Gao, H., Shi, Z., Luo, X., Rice, L. M. & Yu, H. (2020). *ELife.* **9**, e58157.

Liao, S., Rajendraprasad, G., Wang, N., Eibes, S., Gao, J., Yu, H., Wu, G., Tu, X., Huang,

H., Barisic, M. & Xu, C. (2019). *Cell Res.* **29**, 533–547.

Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L.-W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Sammito, M. D., Sobolev, O. V., Stockwell, D. H., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A. G., Videau, L. L., Williams, C. J. & Adams, P. D. (2019). *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **75**, 861–877.

Liu, X., Wang, H., Zhu, J., Xie, Y., Liang, X., Chen, Z., Feng, Y. & Zhang, Y. (2019). *Cell Discov.* **5**, 65.

Liu, Y. & Eisenberg, D. (2002). *Protein Sci.* **11**, 1285–1299.

Loncharich, R. J., Brooks, B. R. & Pastor, R. W. (1992). *Biopolymers.* **32**, 523–535.

Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E. & Simmerling, C. (2015). *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713.

Morales, R., Watier, Y. & Böcskei, Z. (2012). *Journal of Molecular Biology.* **421**, 100–111.

Nieuwenhuis, J., Adamopoulos, A., Bleijerveld, O. B., Mazouzi, A., Stickel, E., Celie, P., Altelaar, M., Knipscheer, P., Perrakis, A., Blomen, V. A. & Brummelkamp, T. R. (2017). *Science.* **358**, 1453–1456.

Pagnamenta, A. T., Heemeryck, P., Martin, H. C., Bosc, C., Peris, L., Uszynski, I., Gory-Fauré, S., Couly, S., Deshpande, C., Siddiqui, A., Elmonairy, A. A., WGS500 Consortium, Genomics England Research Consortium, Jayawant, S., Murthy, S., Walker, I., Loong, L., Bauer, P., Vossier, F., Denarier, E., Maurice, T., Barbier, E. L., Deloulme, J.-C., Taylor, J. C., Blair, E. M., Andrieux, A. & Moutin, M.-J. (2019). *Hum. Mol. Genet.* **ddz186**.

Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. (1977). *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341.

Sanchez-Pulido, L. & Ponting, C. P. (2016). *Bioinformatics.* **32**, 1441–1445.

Sato, Y. (2013). *J. Biochem. (Tokyo).* **153**, 5–11.

- Sonoda, H., Ohta, H., Watanabe, K., Yamashita, H., Kimura, H. & Sato, Y. (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 640–646.
- Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A. & Chambers, J. L. (1977). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 177–193.
- Suzuki, Y., Kobayashi, M., Miyashita, H., Ohta, H., Sonoda, H. & Sato, Y. (2010). *J. Cell Sci.* **123**, 3094–3101.
- Tanabe, K., Sato, Y. & Wada, J. (2018). *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1859.
- Trudeau, T., Nassar, R., Cumberworth, A., Wong, E. T. C., Woollard, G. & Gsponer, J. (2013). *Structure.* **21**, 332–341.
- Wang, N., Bosc, C., Ryul Choi, S., Boulan, B., Peris, L., Olieric, N., Bao, H., Krichen, F., Chen, L., Andrieux, A., Olieric, V., Moutin, M.-J., Steinmetz, M. O. & Huang, H. (2019). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 571–582.
- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Hönigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., Richter, L., Ashkenazy, H., Punta, M., Schlessinger, A., Bromberg, Y., Schneider, R., Vriend, G., Sander, C., Ben-Tal, N. & Rost, B. (2014). *Nucleic Acids Research.* **42**, W337–W343.
- Zhou, C., Yan, L., Zhang, W. & Liu, Z. (2019). *Nat. Commun.* **10**, 3212.

第7章 謝辞

本研究を行うにあたり、東京理科大学基礎工学部生物工学科の西野達哉准教授よりご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

東北大学未来科学技術共同研究センター(NICHe)および東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野の佐藤靖史教授、鈴木康弘助教授のお二方からは、実験の材料やご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

東京理科大学基礎工学部電子工学科の安藤格士博士には、全原子分子動力学(MD)シミュレーションに関して多くのご協力をいただきました。深く感謝申し上げます。

西野研究室の浦田せいあさんをはじめ、研究室のみなさまにお世話になりました。ありがとうございました。

本論文の審査にあたり貴重なご意見を賜りました東京理科大学基礎工学部生物工学科の十島二郎教授、有村源一郎教授、清水公德教授、薬学部生命創薬科学科の宮崎智教授に深く感謝申し上げます。

また、学会発表等でご意見をいただいた多くの方々に感謝申し上げます。