

(様式 1-1)

提出日：2026 年 5 月 1 日

2025 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名

クライオ電子顕微鏡

(2) 研究代表者

氏名： 禾 晃和

所属機関名・部局名・職名：横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授

(3) 研究課題名

膜内切断プロテアーゼ-リガンド複合体のクライオ電子顕微鏡解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名： 加藤 貴之 （研究室名：電子線構造生物学研究室）

(5) 研究成果の概要

膜内切断プロテアーゼは、膜に蓄積するシグナルペプチドや不要な膜タンパク質を除去することにより、膜タンパク質恒常性の維持に必須の役割を果たしている。さらに、ストレス応答、成長因子の活性化、形態形成に関わるシグナル伝達など、生理的に重要な現象に関与するとともに、ヒト疾患の発症や細菌の病原性・感染性の発現にも深く関わっている。代表者らは、膜内切断プロテアーゼの中でも金属プロテアーゼ型の Site-2 protease (S2P) ファミリーに属する大腸菌由来 RseP を対象として構造解析に取り組み、X 線結晶構造を決定した (Imaizumi *et al.*, *Sci Adv* (2022) 8:eabp9011)。さらに、RseP のオルソログについて、基質結合状態でのクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) 構造解析にも成功した (Asahi *et al.*, *Sci Adv* (2025) 11:eadu0925)。これらの解析から、RseP は膜貫通領域内部に形成された空洞に基質膜タンパク質を取り込み、切断を行うことが示された。しかしながら、現時点で得られているクライオ電子顕微鏡構造の分解能は十分とは言えず、基質については側鎖情報を含まないポリアラニンモデルがアサインされた段階にとどまっている。そのため、RseP による基質選別機構を理解する上で不可欠な、基質との結合様式の詳細は未解明のままである。そこで本課題では、大腸菌由来 RseP およびグラム陰性細菌由来オルソログを標的とし、より高分解能な構造決定を目的として、クライオ電子顕微鏡単粒子解析に取り組んだ。

RseP およびそのオルソログは分子量が約 5 万以下と小さな膜タンパク質であるため、電子顕微鏡像の解析には抗体 Fab 断片を fiducial mark として結合させる必要がある。すでにクライオ電子顕微鏡構造解析に成功している超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来オルソログについては、ペリプラズム領域に結合し fiducial mark として適した Fab を取得済みである。そこで、本研究では基質結合状態における分解能向上を目指し、試料調製条件の最適化に取り組んだ。さらに、他のオルソログについても fiducial mark として利用可能な抗体の探索を行った。加えて、脂質二重層環境下での構造解析を目的として、脂質ナノディスクに再構成した試料を用いたクライオ電子顕微鏡データ収集にも取り組んだ。