

マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質, PfERC に内在する Disorder 領域の予測

**Prediction of intrinsically disordered region of *Plasmodium falciparum*
endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, PfERC**

坂 本 沙 祐 里
山 田 名 都 美
平 岡 修

マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質, PfERC に内在する Disorder 領域の予測

Prediction of intrinsically disordered region of *Plasmodium falciparum*
endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, PfERC

坂本 沙祐里 (医療薬学研究科)

SAKAMOTO Sayuri

山田 名都美 (薬学科)

YAMADA Natsumi

平岡 修* (医療薬学研究科・薬学科)

HIRAOKA Osamu

*責任著者: hiraoka@shujitsu.ac.jp

[Abstract]

We previously attempted X-ray crystal structure analysis to study the structure and function of the *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein (PfERC), which is the target protein of N-89, a novel antimalarial drug candidate. Despite a suggestion that the crystallization sample prepared using *E. coli* is suitable for the investigations, it appeared to be not the case, due to the substantial structural changes upon high-affinity binding with calcium ions, and monodispersity in dynamic light scattering analysis. In the present study, we identified an interesting phenomenon in the process of investigating the underlying cause. We found that there are two types of structures that cause conformational changes after calcium binding in the prepared sample, which was thought to be uniform. Furthermore, two specific sites were characterized as regions of limited breakdown during storage for one week at 4° C. We, therefore, used various predictive programs of disorder regions in the vicinity of the cutting sites and were able to predict the presence of three main disorder regions. Our results suggest that PfERC is a type of intrinsically disordered protein.

Keywords: malaria, PfERC, N-89, PONDR, intrinsically disordered region

【緒言】

現在, 既存薬に対する薬剤耐性マラリア原虫が出現しており新しい作用機序を有する抗マラリア薬の開発が求められている. その候補化合物の1つとして岡山大学のグループにより提案された N-89 (1,2,6,7-tetra-oxaspiro [7.11] -nona-decane) が挙げられる¹⁾. N-89は既存薬であるクロロキンの耐性株に *in vivo* で有効であり, さらにその標的タンパク質として PfERC が関与していることが示唆されている¹⁾. PfERC はマラリアに固有の343アミノ酸残基からなる分子量約40kDa のタンパク質で, N 末端にシグナル配列, 内部に6つの EF ハンドモチーフ, C 末端に小胞体局在性シグナルを有するカルシウム結合タンパク質であるが, その機能については解明されていない. そこで, 我々は PfERC の構造と機能を解明する目的で X 線結晶構造解析を試みてきた. 我々が調製した試料は種々の生化学的, 物理化学的解析により結晶化用試料として適していると思われたにも関わらず, 未だに結晶化に成功していない²⁾. その理由として PfERC が天然変性タンパク質である可能性が考えられる. 天然変性タンパク質は *intrinsically disorder* (ID) 領域を有していて, 単独ではポリペプチド鎖が大きく揺らいだ変性状態として存在しているが, パートナータンパク質と結合すると, パートナー分子の構造に応じて規則正しく折りたたまれて特定の立体構造を誘起させて分子認識を行っており, 単独では結晶化しにくいと考えられる³⁾.

代表的な天然変性タンパク質の例としては, p53やカルシニューリンなどがある. p53は, N 末端側から5つの主要なドメイン (転写活性化ドメイン, プロリンリッチドメイン, DNA 結合ドメイン, 四量体形成ドメイン, 塩基性ドメイン) で構成されている393アミノ酸残基からなるタンパク質で, N 末端の93アミノ酸残基は固有の構造を持たない *disorder* 領域である. p53は, DNA の損傷や酸化, 飢餓など様々なストレスから細胞を守り, がん化することを防ぐ働きがある. このような多様な働きからも予想できる通り, 細胞内では様々なタンパク質と相互作用している. 実際に, *order* 領域のみならず, *disorder* 領域にも15種類以上のタンパク質が結合することが知られており, 立体構造の揺らぎを最大限に利用する天然変性タンパク質ならではの存在である⁴⁾. また, カルシニューリンにも *disorder* 領域が存在する. カルシニューリンは4つの EF ハンドモチーフを有するカルシウム結合性のカルモジュリン依存性セリン/トレオニンホスファターゼであり, 構造中に95アミノ酸残基からなる *disorder* 領域を有し, そこにカルモジュリンが結合することでカルシニューリンが活性化される.

以上より, PfERC の結晶化が困難であるのは PfERC の分子内に *disorder* 領域が存在し, 特定の構造を取っていない可能性があると考えた. そこで PfERC が天然変性タンパク質であると推測される幾つかの知見を示すとともに, *disorder* 領域の予測プログラムを用いて PfERC が天然変性タンパク質である可能性について検討したので報告する.

【方法】

1. 大腸菌を用いた遺伝子組換えタンパク質の発現及び精製とその活性評価

pMALc-4x- Δ PfERC (27-343)-6His 発現ベクターで形質転換された *E. coli* Lemo21 (DE3) 株 (NEB 社製) を Overnight Express 培地 (Novagen 社製) で 25°C にて 24 時間培養した後、細胞内可溶性画分を BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen 社製) を用いて調製し、得られた画分を、ニッケルキレートカラム (20mM Tris-Cl, 0.15M NaCl, 10mM Imidazole, pH7.5 で平衡化) に吸着させた後、20mM Tris-Cl, 0.15M NaCl, 0.5M Imidazole, pH7.5 で溶出させた。次に溶出画分をアミロースカラム (20mM Tris-Cl, 0.15M NaCl, pH8.0 で平衡化) に吸着させた後、20mM Tris-Cl, 0.15M NaCl, 10mM Maltose, pH8.0 で溶出させた。得られた融合タンパク質を 16°C で 48 時間、Factor Xa protease により消化して MBP (maltose binding protein) タグ及び 6His タグを除去した後、1mM CaCl₂ を含む 20mM Tris-Cl, pH8.0 緩衝液で平衡化した UNO™ Q6 陰イオン交換カラム (12mm ID x 53mm L; BIO-RAD 社製) に添加して 0-0.3M NaCl の濃度勾配で溶出させ、最終精製物を得た。得られた発現産物の評価は、0.15M NaCl を含む 20mM Tris-Cl, pH8.0 緩衝液で平衡化した Superdex™ 200 10/300 GL (1.0 x 30cm L; GE Healthcare 社製) カラムでゲルろ過クロマトグラフィーを行い、1mM CaCl₂ 存在下及び非存在下における発現産物の移動度の変化を解析することにより、機能体として働くか否かの確認を行った²⁾。

2. Protein thermal shift (PTS) assay

PfERC (8 μ M), CaCl₂ (1mM), そして Protein Thermal Shift™ Dye (Life Technologies 社製) を 0.15 M NaCl を含む 20m M Tris-Cl, pH 8.0 緩衝液中で混合し、StepOne™ Real-Time PCR 装置 (Applied Biosystems 社製) を用いて熱安定性を解析した。25°C から 99°C の温度範囲を 0.05°C/sec の速さで変化させたときの蛍光強度の変化を測定し、熱安定性を融解温度 (T_m) の値で評価した。

3. アミノ酸配列解析

エドマン法により、4°C で 1 週間放置後に生じた degraded fragments の N 末端アミノ酸配列を解析した。

4. タンパク質中の disorder 領域の予測

タンパク質中の disorder 領域を予測するプログラム PONDR (Predictors of Natural Disordered Regions) ®VSL2 を用いて PfERC に内在する変性領域の予測を行った (<http://www.pondr.com/>)。

【結果】

1. 大腸菌を用いた PfERC 発現産物の解析

Fig. 1 に *E. coli* Lemo21 (DE3) 株を用いて高発現させた PfERC の精製過程を示した。得られた発現産物は SDS-PAGE 解析により少なくとも 3 種類存在することがわかった (フ

ラクシオン1、2、3) (Fig.1, Fig.2). このとき, フラクシオン1及びフラクシオン2の陰イオン交換カラムからの溶出時間は全く同じで, それぞれの分子の表面電荷に差がないことが示された (data not shown). 次に, フラクシオン1及びフラクシオン2のカルシウム結合能の有無とその結合に起因する構造変化を起こすか否かをゲルろ過法により確認した. Fig.3に示すように, フラクシオン1 (単量体) に1mMのカルシウムイオンを添加すると過不足なく分子サイズが低分子側に移行した. このことはフラクシオン1がカルシウム結合能を有し, 結合後に立体構造全体がコンパクトなサイズに均一に変化したことを示している. データは示さないが, 同様の結果が, フラクシオン2 (単量体) においても観察された. これらの結果は, 得られた2種類の発現産物が単量体の活性型であることを示している. ちなみに, フラクシオン3は, 沈殿を起こしやすい高分子の会合体 (単量体ではない) であることがゲルろ過法により確認されたので結晶化用試料として採用しないこととした (data not shown).

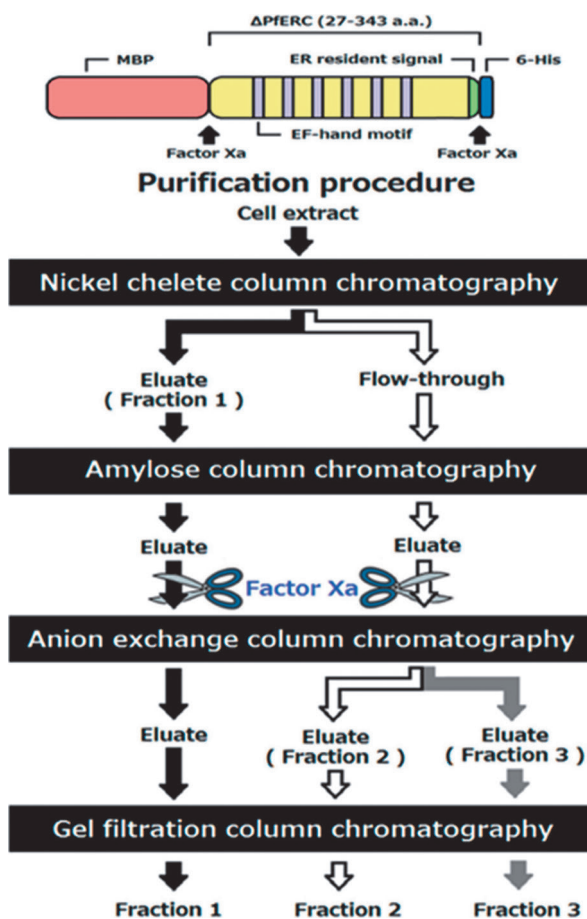
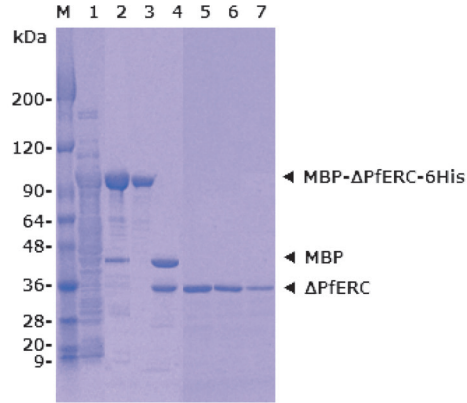


Fig.1 遺伝子組換え PfERC の発現及び精製過程



5-20% SDS-PAGE

Coomassie Brilliant Blue Stain

M : Marker

Lane 1 : Cell extract

Lane 2 : Ni-NTA column chromatography

Lane 3 : Amylose column chromatography

Lane 4 : Factor Xa digestion

Lane 5 : Anion exchange chromatography (Fraction 1)

Lane 6 : Anion exchange chromatography (Fraction 2)

Lane 7 : Anion exchange chromatography (Fraction 3)

Fig. 2 PfERC 精製過程における SDS-PAGE 解析

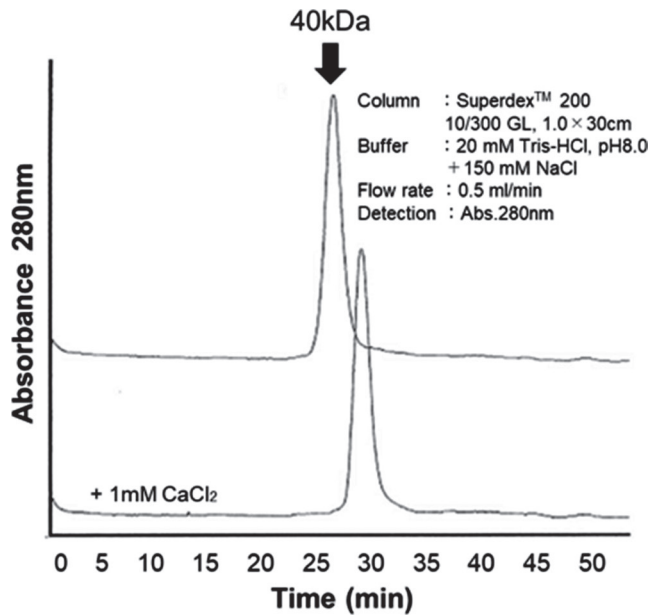


Fig. 3 ゲルろ過法による PfERC フラクション 1 のカルシウムイオン結合活性と構造変化の解析

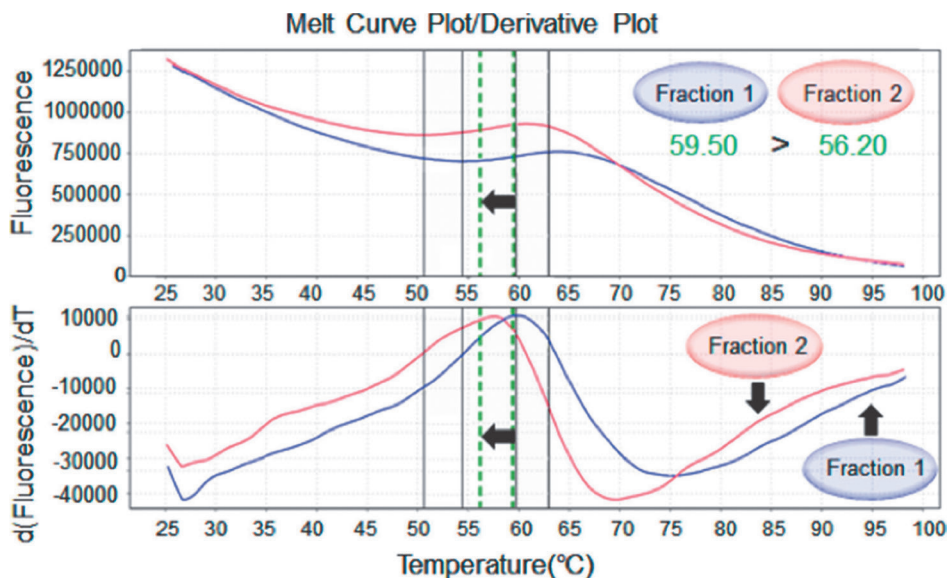


Fig. 4 Protein thermal shift (PTS) assay による PFERC の熱安定性の測定

2. Protein thermal shift (PTS) assay による精製 PFERC の熱安定性の測定

PTS (protein thermal shift) 法により, フラクシオン 1 及びフラクシオン 2 の熱安定性を測定して比較したところ, フラクシオン 1 の T_m は 59.50°C , フラクシオン 2 は 56.20°C となり, フラクシオン 2 はフラクシオン 1 に比べ, T_m が 3.3°C も低いことが確認され, 分子の表面電荷が同じであるにもかかわらず立体構造がそれぞれ異なることが示唆された (Fig. 4).

3. 4°C で保存後の PFERC の限定分解

Fig. 5 は, PFERC のフラクシオン 1 を 4°C で 1 週間放置した後の SDS-PAGE 解析の結果である. 25kDa と 10kDa 付近に特異的に分解されたバンドが観察された. これらのバンドをそれぞれエドマン法によりアミノ酸配列解析を行ったところ, 7 番目と 8 番目の間及び 179 番目と 180 番目の間が限定分解されていることが分かった. なお, この結果は, フラクシオン 2 においても同様に観察された (data not shown) .

4. PFERC の切断部分と disorder 領域予測プログラムの解析結果

Fig. 6 は, disorder 領域予測プログラムである PONDR[®]VSL2 を用いて PFERC 中の disorder 領域の予測を行った結果である. PONDR は論文などから実験的に確認された既知のアミノ酸配列と disorder 領域の間の相関を収集したデータベース (DisProt)¹⁵⁾ に含まれる情報をもとにして予測を行う方法である. PONDR には VLXT, VSL2, 及び VL3 など, 様々な予測変数がある. 予測変数の 2 番目の文字は disorder 領域の長さを示している. L は Long, S は Short を意味しており, Long は 40 残基以上, Short は 8-9 残基とされている. VLXT は Long と Short のどちらも測定できるが, 40 残基以上の長い disorder 領域の測定

には信頼性があり, 短い disorder 領域の測定は信頼性が低いという特徴がある. また, VL3は長い disorder 領域しか測定することができない. また, VSL2は長さに関係なく disorder 領域を予測することができ, PONDR の予測変数の中で最も正確な予測変数であると示されていたため, 本研究では PONDR®VSL2を用いて測定を行った. 数値が0.5を超えると disorder 領域であることを示している. 今回, 限定分解を受けた部位 (7番目と8番目の間, 179番目と180番目の間) はいずれも disorder 領域内に存在しており, 変性状態でしっかりとした高次構造を形成していないために限定分解を受けてしまったと考えられる. 結果は示さないが, 他の解析ソフトを用いた場合も同様の結果が得られた.

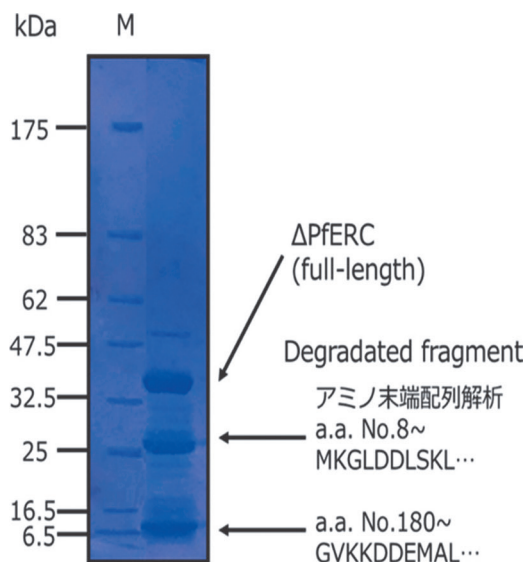


Fig.5 4°Cで一週間保存後の PfERC フラクション1の限定分解

【考察】

我々は, これまでに新規抗マラリア薬候補化合物, N-89の標的タンパク質である PfERC の構造と機能を解析する目的で X線結晶構造解析を試みてきた. これまでの発現方法は, PfERC の N 末端に MBP を融合させたシングルタグシステムによって行われた. 調製した結晶化用試料は, カルシウムイオンと高親和性で結合した後に大きく構造変化を起こすことから活性型であることが確認され, さらに動的光散乱法を用いた解析により単分散性を示すなど, 結晶化用試料として適していると示唆されたにもかかわらず成功に至らなかった²⁾. その原因として, C 末端の欠失により均一な試料が得られていなかった可能性が考えられたので, 今回, N 末端に MBP, C 末端に 6His を融合させたダブルタグシステムを用いて発現及び精製を行い, C 末端の欠失体を完全に除去する方法を選択した. その結果, 均一であると思われた前回調製試料中に, カルシウム結合後に構造変化を起こす 2 種類の構造体 (フラ

クション1及びフラクション2)が混在することが判明した (Fig. 1). フラクション1及びフラクション2は, 陰イオン交換クロマトグラフィーにより表面電荷が同じであり, ゲルろ過クロマトグラフィーによりどちらも単量体であることが確認されたにもかかわらず, フラクション2がニッケルキレートカラムに結合しなかったことからC末6Hisタグの欠失体である可能性が考えられた (Fig. 1). そこで, C末欠失体であるか否かを確認する目的で, PTS法によりフラクション1及びフラクション2の熱安定性を比較したところT_m値が3.3℃も差があり, それぞれの構造が大きく異なることが示唆された. C末が一部欠失した程度では, このような差は生じないと思われるので, これまでのシングルタグシステムによる精製試料には, アミロースカラムに結合する少なくとも2種類の構造体 (フラクション1及びフラクション2) が混在しており, そのことが結晶化の成功に至らなかった原因の1つであると考えられる. また, データは示さないが, ニッケルキレートカラムに結合しなかったフラクション2に対して6His抗体を用いたウエスタンブロット法により解析を行ったところ, C末欠失体でないことを確認している. 現在, フラクション1及びフラクション2をそれぞれ精製して, それぞれ単独で結晶化実験を進行させている.

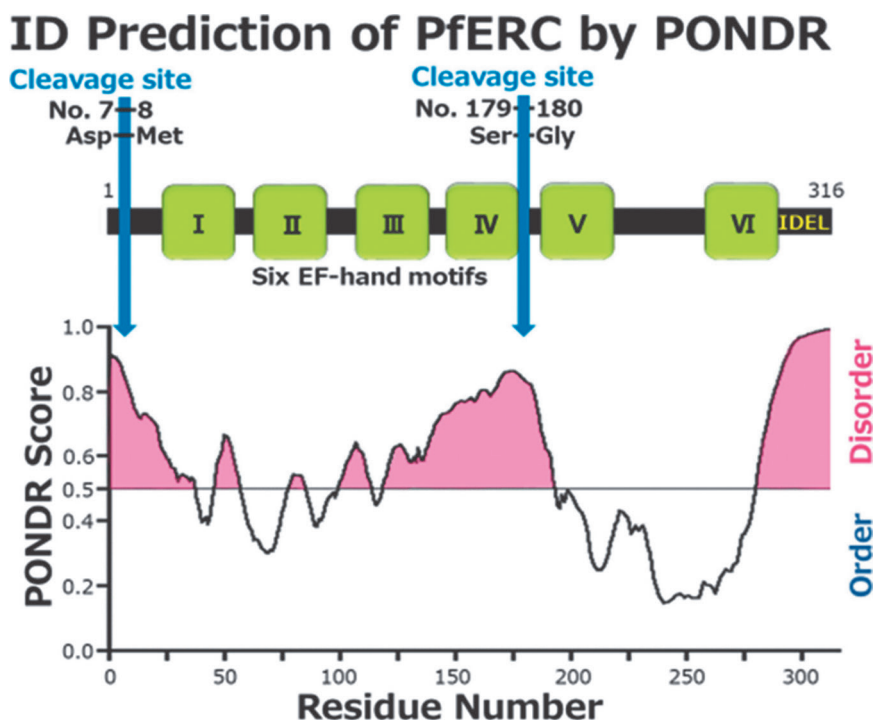


Fig.6 PfERC 中の限定分解部位と PONDR を用いた disorder 領域の予測結果
(<http://www.pondr.com/>)

さらに, 結晶化が成功しなかったもう一つの原因としては, PfERC が天然変性タンパク質であることが考えられる. 一般に, タンパク質は固有の立体構造を形成して機能するのが基本的なあり方だが, 立体構造を形成しない領域を持つ天然変性タンパク質の存在が明らか

となってきた。結晶構造解析は、均質な立体構造を持つもの（機能を持った構造）の立体構造を解析する技術であり、結晶化しにくいフラフラした領域をあえて取り除いた構造を追いかけてきた。しかしながら、そのタンパク質の立体構造研究が全盛を極めた1980年代から1990年代にかけて、不規則なネイティブ構造に焦点を当てた研究の報告がいくつかあった。転写因子が構造を持たないという報告⁵⁾、カゼインは安定な三次元構造を持たないという報告⁶⁾、タウタンパク質のC末端領域を指して天然変性という言葉を用いた報告⁷⁾など天然変性タンパク質の姿がわずかに見え始めてきた^{8), 9)}。天然変性タンパク質は、生物種や機能によって存在に偏りがあり、真核生物に多いことが知られている。30残基以上の不規則な領域のある天然変性タンパク質の割合は、真正細菌では4.2%、古細菌では2.0%であるが真核生物では33%にも及ぶ¹⁰⁾。つまり、天然変性タンパク質は真核生物にとってはありふれたタンパク質であることから^{11), 12), 13)}、PfERCが天然変性タンパク質の1種であると考えerことは、なんら不思議なことではない。

今回、Disorder領域解析ソフト、PONDRを用いてPfERCの解析を行ったところ、3ヶ所に40残基以上の長いdisorder領域が存在している事が示唆された (Fig. 5)。タンパク質中のdisorder領域を予測するプログラムには様々な種類が存在するが、PONDRはdisorder領域の予測ソフトとして広く使用されており、40残基以上の長いdisorder領域を予測することができる。また、PONDRの開発者であるDunkerらの論文¹⁴⁾をはじめ、その他、実際にPONDRを用いて解析された結果が掲載された論文が数多くアクセプトされており信頼性の高いソフトである。従って本研究においてもPONDRを使用して解析を行った。さらに、disorder領域が単純にプログラムによる過剰予測の結果である可能性も考慮して、POODLE (Prediction Of Order and Disorder by machine Learning)¹⁶⁾やPrDOS (Protein Disorder Prediction System)、DisEMBLなどの別の予測ソフトを用いて解析を行ったところ、PONDRと同様の結果が得られたため、PfERCにdisorder領域が存在する可能性は高いと考えられる (data not shown)。一般に、disorder領域は変性領域でしっかりとドメイン構造を取っていないため、プロテアーゼの攻撃を受け切断されやすいと考えられるが、今回の結果はそのことを支持している (Fig. 4)。

本研究室の片山の論文¹⁷⁾によると、PfERCはカルシウム結合性を有するカルネキシン及びカルレティキュリンと類似していると推測している。カルレティキュリンはレクチン様分子シャペロンで、6つのEFハンドモチーフを有しHsp70 (Heat shock protein 70)などのシャペロンと共働して、小胞体においてタンパク質の折りたたみに関与している。PfERCも小胞体に局在し、EFハンドモチーフを有するカルシウム結合タンパク質であることからカルレティキュリン様の働きを持つ可能性がある。この仮説は、実際にN-89を固定化したカラムからPfERCと一緒にHsp70が溶出されることから、その可能性が示唆される¹⁾。カルレティキュリンはその性格上特定の分子と1:1で特異的に結合するようなタンパク質ではなく、Hsp70やPDI (Protein Disulfide Isomerase)などの様々なシャペロンタンパク

質及び基質である変性状態のタンパク質と結合することが知られており, 天然変性タンパク質の候補であると考えられる. 実際に本研究に使用した PONDR を使ってカルレティキュリンの disorder 領域を検索したところ, 2ヶ所の長い disorder 領域が予測された (data not shown). したがって, PFERC がカルレティキュリン同様に複数のタンパク質と disorder 領域を介して結合する天然変性タンパク質であることが想定される.

実際に, disorder 領域の有無を実験的に証明していくためには, ドロップレット (小滴) の形成を検討することが有用である. テキサス大のグループは, 2種類の天然変性タンパク質を試験管内で混合すると溶液中で数マイクロメートルほどの球状のドロップレットが形成され, 液-液相分離することを示した¹⁸⁾. このドロップレットの形成は変性領域が長いほど形成しやすいという結果であった. したがって, 今後, PFERC を他の天然変性タンパク質と混合することによりドロップレットが形成されるか否か検討する必要がある.

以上より, PFERC が天然変性タンパク質であるという仮説が正しいとするならば, PFERC 単独での結晶化は困難であり, PFERC の disorder 領域に特異的に結合するタンパク質との共結晶を作らせることが必要であろうと考えられる. 実際に p53やカルシニューリンなどの天然変性タンパク質は単独あるいは単量体として X線結晶構造解析に成功していないことを考慮すると, PFERC とパートナータンパク質との共結晶の作成が今後の研究の方向性を示していると思われる.

【利益相反】

本論文について他者との利益相反はない.

【引用文献】

- 1) 森田将之, 環状過酸化物の抗マラリア作用機序の解析. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士論文, (2014)
- 2) 平岡修 他, マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質の大腸菌を用いた高発現をその特性解析. 就実大学薬学雑誌 (1), 42-50 (2014)
- 3) 西川建, 天然変性タンパク質とは何か?, 生物物理, 49 (1), 004-010 (2009)
- 4) M. Wells, Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (15), 5762-5767 (2008)
- 5) P.B. Sigler, Transcriptional activation. Acid blobs and negative noodles, *Nature*, 333 (6170), 210-212 (1998)
- 6) C. Holt, Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions, *Protein Enz.*, 2 (4), 251-259 (1988)
- 7) O. Schweers, Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical

- filaments show no evidence for beta-structure, *J. Biol. Chem.*, 269 (39), 24290-24297 (1994)
- 8) P.E. Wright, Intrinsically unstructured proteins : re-assessing the protein structure-function paradigm, *J.Mol.Biol.*, 293 (2), 321-331 (1999)
 - 9) P. Tompa, et al., Structure and function of intrinsically disordered proteins, *CRC Press* (2009)
 - 10) J.J. Ward et al., Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdom of life, *J.Mol.Biol.*, 337 (3), 635-645 (2004)
 - 11) V.N. Uversky et al., Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions?, *Proteins*, 41 (3), 415-427 (2000)
 - 12) A.K. Dunker et al., Intrinsically disordered protein, *J. Mol. Graph.Model.*, 19 (1), 26-59 (2001)
 - 13) P. Tompa, Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem.Sci.*, 27 (10), 527-533 (2002)
 - 14) B. Xue, et al., A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et biophysica acta*, 1804 (4), 996-1010 (2010)
 - 15) S Vucetic et al., A database of protein disorder. *Bioinformatics*, (21), 137-140 (2005)
 - 16) 野口保, タンパク質 disorder 領域予測法の最前線. *生物物理*, (47), 248-252 (2007)
 - 17) 片山陽, マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質, PfERC の機能予測について. *就実大学卒業論文*, (2017)
 - 18) P. Li et al., Phase transitions in the assembly of multivalent signaling proteins, *Nature*, 483 (7389), 336-340 (2012)