

膜タンパク質ストマチンの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼの機能

横山 英志

Three-dimensional Structure of Membrane Protein Stomatin and Function of Stomatin-specific Protease

Hideshi YOKOYAMA

Department of Physical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received May 29, 2010)

Stomatin is a major integral membrane protein of human erythrocytes, the absence of which is associated with a form of hemolytic anemia known as hereditary stomatocytosis. It is reported that stomatin regulates the gating of acid-sensing ion channels in mammalian neurons. However, the function of stomatin is not fully understood. In the genomic sequence of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*, the putative operon-forming genes PH1511 and PH1510 encode stomatin and its partner protein, respectively. The N-terminal region of PH1510p (1510-N) is a serine protease, and specifically cleaves the C-terminal hydrophobic region of stomatin PH1511p. We have determined the first crystal structure of the core domain of stomatin PH1511p (residues 56–234, designated as PhSto^{CD}). This review focuses on the three-dimensional structure of PhSto^{CD}, and discusses the function of stomatin and its specific protease 1510-N. PhSto^{CD} forms a novel homotrimeric structure. Three α/β domains form a triangle of about 50 Å on each side, and three α -helical segments about 60 Å in length extend from the apexes of the triangle. The α/β domain of PhSto^{CD} is partly similar in structure to the band-7 domain of mouse flotillin-2. While the α/β domain is relatively rigid, the α -helical segment shows a conformational flexibility, adapting to the neighboring environment. One α -helical segment forms an anti-parallel coiled-coil with another α -helical segment from a symmetry-related molecule. The α -helical segment shows a heptad repeat pattern, and mainly hydrophobic residues form a coiled-coil interface. The coiled-coil fold observed in the crystal probably contributes to the self-association.

Key words—stomatin; crystal structure; coiled-coil; *Pyrococcus horikoshii*; flotillin

1. はじめに

ストマチンは、ヒトの赤血球膜上で発見され脂質ラフトに存在する膜タンパク質であり、そのタンパク質が欠損すると遺伝性有口赤血球症 *stomatocytosis* を引き起こす。この疾患は、Na⁺ や K⁺ などのイオンが生体膜を異常に透過することが原因と考えられることから、ストマチンはイオンチャネルの制御因子と考えられてきた。^{1,2)} 近年、哺乳動物の神経細胞に存在する電位非依存性のナトリウムチャネルである酸感受性イオンチャネルの開閉をストマチンが制御することが報告された。³⁾ またストマチン様

タンパク質 (Stomatin-like protein 3, SLP3) が皮膚の機械刺激受容器の機能に必須であること、⁴⁾ さらに線虫のストマチンオルソログ MEC-2 が接触感覚受容器と相互作用しその活性を制御すること⁵⁾ も報告されている。

ヒトのストマチンは、アミノ (N) 末側に膜貫通領域とパルミトイル化されたシステイン残基があって生体膜に強く会合しており、⁶⁾ 分子量 250–300 kDa の 9–12 量体を形成している⁷⁾ と報告されている。またカルボキシ (C) 末側にある疎水性領域が多量体形成に重要でありその領域が生体膜との会合に必須であるとの報告もある。⁸⁾ ストマチンの分子レベルでの機能は解明されていないが、脂質ラフトに局在し多量体の足場タンパク質やシグナル伝達物質として機能するのではないかと予想される。

ストマチンはほとんどすべての種にそのオルソロ

静岡県立大学薬学部生命物理化学分野 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: h-yokoya@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成 21 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

グが存在する。⁹⁾いくつかの種においてはストマチンとそのパートナー遺伝子がオペロンを作っている。²⁾超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* では PH1511p がストマチン, PH1510p がパートナータンパク質である。われわれは PH1511p と PH1510p の構造と機能の解明を目指し, ストマチン PH1511p のコアドメインの三次元構造を X 線結晶構造解析により初めて明らかにした。¹⁰⁾さらに PH1510p の N 末側可溶性ドメイン (1510-N) は, 触媒残基として Ser-Lys dyad を有するセリンプロテアーゼであり, 疎水性残基を好んで切断することを明らかにした。¹¹⁾また 1510-N の X 線結晶構造解析の結果, 触媒残基が疎水性ポケットを形成しており疎水性残基を取り込むのに適した構造になっていることも明らかにした。¹²⁾興味深いことに 1510-N はストマチン PH1511p の C 末側にある疎水性領域を特異的に切断する。¹¹⁾本総説では, ストマチンのコアドメインの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼ

1510-N との機能相関について述べる。

2. ストマチンコアドメインの全体構造

アミノ酸配列情報から PH1511p は N 末側に 2 回膜貫通領域を有すると考えられる膜タンパク質である。その三次元構造を決定するため, 全長 266 残基中, N 末側の膜貫通領域と C 末側の疎水性領域を除いた 56–234 残基 (*Pyrococcus horikoshii* Stomatins Core Domain, PhSto^{CD}) について, 大腸菌発現系によりタンパク質を調製し, セレノメチオニン置換体を用いて X 線回折強度データを収集し, 多波長異常分散法により分解能 3.2 Å で構造を決定した (PDB: 3bk6)。¹⁰⁾

得られた PhSto^{CD} はホモ三量体で, 各モノマーは 56–169 残基からなる α/β ドメインと 170 残基以降からなる α ヘリカルセグメントから構成される [Figs. 1 (a) and (b)]. PhSto^{CD} の三量体のうち A 鎖は 56–224 残基, B 鎖は 56–196 残基, C 鎖は 56–214 残基までの構造が決定できた。 α/β ドメインは

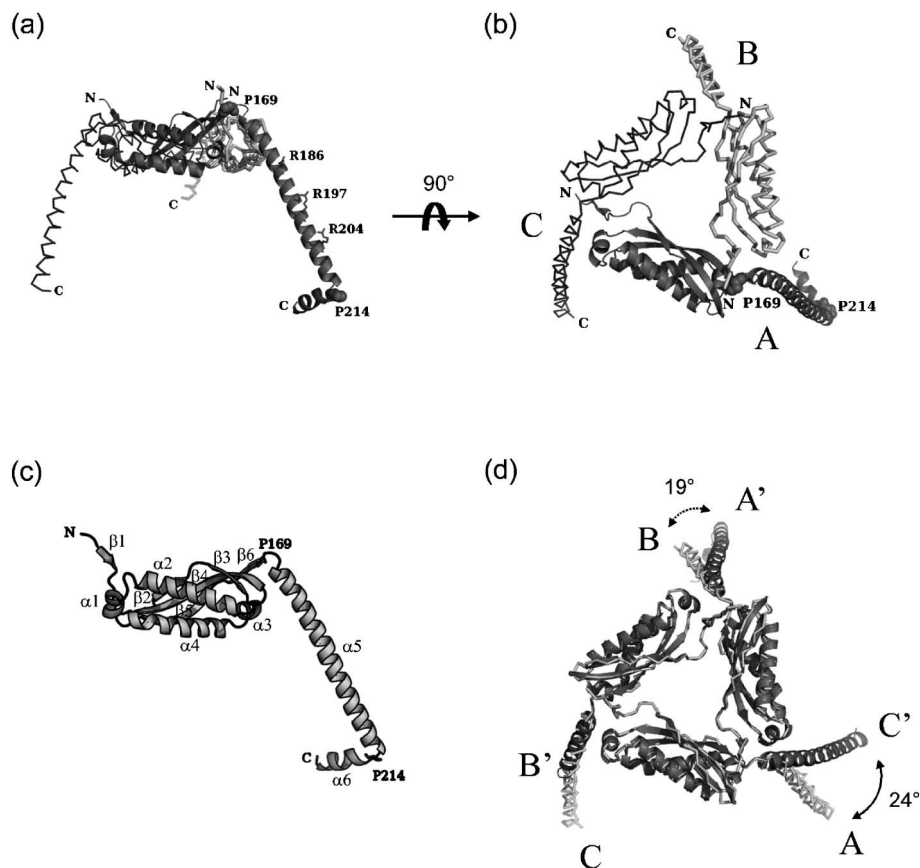


Fig. 1. Overall Structure of PhSto^{CD} Trimer

(a) Side view. (b) Top view. (c) The secondary structure elements are labeled with the monomer (chain A) of PhSto^{CD}. (d) Superposition of the C α traces of PhSto^{CD} protomers. The α/β domain (residues 56–169) of chain A is superposed on that of chain B, and the superposed chain A is labeled as chain A'. The same superpositions were performed: chain B to chain C (labeled as chain B'), and chain C to chain A (labeled as chain C').

N 末から $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \beta 5, \beta 6$ の順に並んでいる [Fig. 1(c)]. 3つの α/β ドメインは一辺 50 Å, 高さ 20 Å の三角形を形成しており, 逆平行 β ストランド ($\beta 2-\beta 6$) は連続した α ヘリックス ($\alpha 1-\alpha 4$) に取り囲まれるように位置している. α ヘリカルセグメントは長さ 60 Å, 11 ターンの長い $\alpha 5$ ヘリックスから主に構成されている. $\alpha 5$ の両端には Pro-169 と Pro-214 がありそこでヘリックスは大きく折れ曲がっている.

2つのモノマー間の接触面積はそれぞれ異なり, 1600–1800 Å² となっている. 接触部分において一方のモノマーの $\beta 1$ と $\alpha 1$ が他方のモノマーの $\beta 6$ と $\alpha 5$ と相互作用している. α/β ドメインの各モノマー同士の C α 原子を重ね合わせた場合, どの場合もその根二乗平均偏差 (root mean square deviation, R.M.S.D.) は 0.4–0.5 Å 程度と小さく, よく重なる. 一方, α ヘリカルセグメントの C α 原子を各モノマー同士で重ね合わせた場合, A 鎖と B 鎖とでは R.M.S.D. 1.82 Å, C 鎖と A 鎖とでは R.M.S.D. 2.31 Å と大きく, α/β ドメインの三角形の各頂点を基点としてそれぞれ 19°, 24° も傾いている [Fig. 1(d)]. これらの構造の差異については次章で述べる.

Protein Data Bank に登録されている構造から PhSto^{CD} の構造と類似構造がないか検索したところ, マウス由来フロチリン-2 の band-7 ドメインの構造 (PDB: 1win) が PhSto^{CD} の α/β ドメインの構造と類似していることが分かった. フロチリンはストマチンと同じ SPFH ファミリー (Stomatin-Prohibitin-Flotillin-HflK/C) に属するタンパク質で, そのうちフロチリン-1 はクラスリン非依存性エンドサイトーシスの制御因子であり,¹³⁾ フロチリン-2 は膜小胞輸送の機能に関与することが報告されている.¹⁴⁾ 最近, 赤血球の貯蔵中に生じる膜小胞中にストマチンが多量に含まれることからストマチンが膜小胞形成に関与することが報告されている.¹⁵⁾ フロチリンとストマチンは構造が類似しており膜小胞形成に関与するなど共通点がみられる.

3. コイルドコイル構造と生体膜との相互作用モデル

PhSto^{CD} の結晶構造において A 鎖の $\alpha 5$ ヘリックスは結晶中の隣の分子の C 鎖の $\alpha 5$ ヘリックスと逆平行にコイルドコイル相互作用している [Figs. 2(a)

and (b)]. $\alpha 5$ ヘリックスは Fig. 2(c) のヘリカルホイール図で heptad repeat パターンを示している. a と d の位置には疎水性残基が集中しており, 結晶中で隣り合う分子の $\alpha 5$ ヘリックス同士が a と d の位置の疎水性残基を介して相互作用している. 一方, $\alpha 5$ ヘリックスの c, f, g の位置には極性残基が多く存在し, 溶媒に露出していると考えられる. 2つの $\alpha 5$ ヘリックス同志の分子間の接触面積は 1800 Å² であり, 各モノマー間の接触面積と同程度である. 結晶構造中で, B 鎖の $\alpha 5$ ヘリックスはほかとの相互作用がみられないが, A 鎖と C 鎖の $\alpha 5$ ヘリックスはコイルドコイル相互作用するため Fig. 1(d) にみられるように α/β ドメインの三角形の各頂点を基点として構造が変化すると考えられる. またこのことから, $\alpha 5$ ヘリックスは α/β ドメインに比べて柔軟性が高く, 周辺的环境に応じて大きく構造変化することが可能であると考えられる.

PhSto^{CD} の N 末には疎水性残基が存在しており, その先に PH1511p の 2 回膜貫通領域が存在すると考えられることから, Fig. 1(a) で α/β ドメインの上側が生体膜と相互作用すると考えられる. また $\alpha 5$ ヘリックスの外側には正電荷を帯びたアルギニン残基 (Arg-186, Arg-197, Arg-204) が存在している [Fig. 1(a)]. $\alpha 5$ ヘリックスが α/β ドメインの三角形の各頂点を基点として動くことにより, これらのアルギニン残基が生体膜の負電荷を帯びたリン酸基と静電相互作用するのではないかと予想される. 近年, ストマチン様タンパク質 (Stomatin-like protein 2, SLP2) が, ミトコンドリアの膜融合に係わる mitofusin-2 とヘテロ多量体を形成することが報告されている.¹⁶⁾ ストマチン PH1511p の $\alpha 5$ ヘリックスが生体膜に相互作用し, ストマチン分子同士, 若しくはストマチンと他の分子が $\alpha 5$ ヘリックスを介したコイルドコイル相互作用により会合し, SLP2 のように膜融合の機能に関与するのかもしれない.

4. ストマチン多量体とプロテアーゼによる切断

PH1511p とヒトのストマチンはアミノ酸配列の相同性が 43% と比較的高い. ヒトのストマチンは多量体を形成しており, C 末側の 264–272 残基 (²⁶⁴STIVFPLP²⁷²) が多量体形成に重要であると報告されている.⁸⁾ PH1511p においては 234–242 残基 (²³⁴NVIVLMLPM²⁴²) がその領域に相当する (Fig.

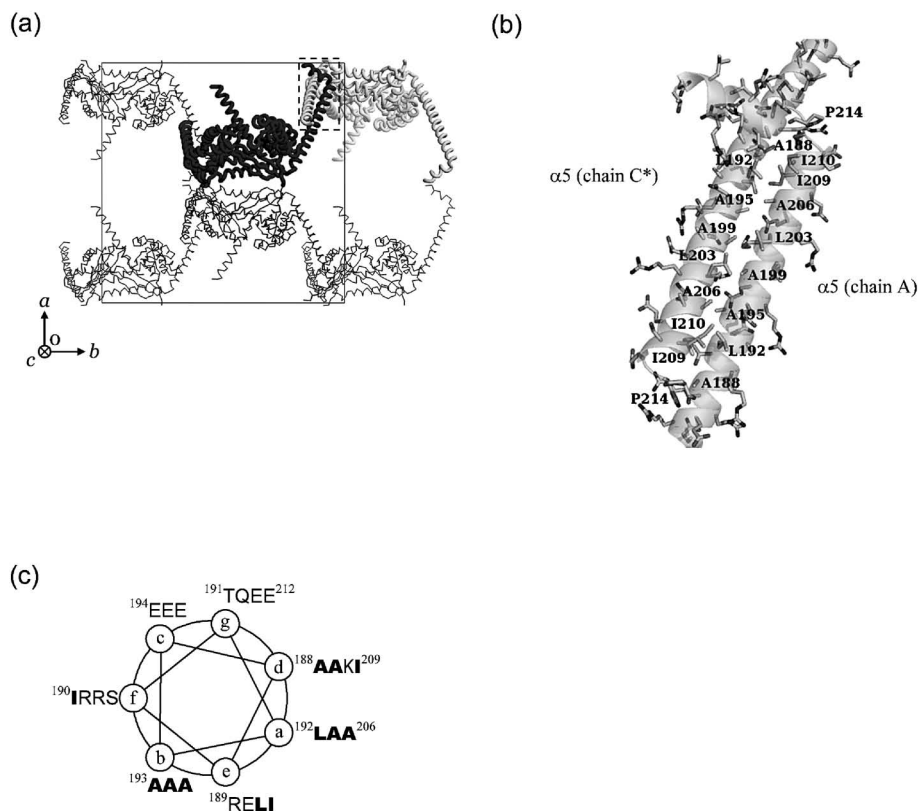


Fig. 2. Coiled-coil interaction

(a) Crystallographic symmetry-related molecules of PhSto^{CD} with a unit cell. (b) Close-up view of the region surrounded by the dotted frame in (a). One $\alpha 5$ (chain A) interacts with another $\alpha 5$ (chain C*) of a symmetry related molecule (indicated as asterisk). (c) Residues 188 to 212 of $\alpha 5$ are projected onto helical wheels in the clockwise direction from residue 188. Bold letters show hydrophobic residues.

PH1511	228	V A G D K S N V I V L M L P M E M L K L F K S	250
PAB1933	228	V A S D K S N V I V L M L P M E M L K L F K S	250
PA0452	226	I A G D K S S T I V F P M P I E L F G G K Y A	248
SMB20989	228	I A G E K N S T I I F P P M E I A D M L A T	250
MEC-2	346	I S A E K N S T I I F P P I D L S A F L Q	368
stomatin	258	<u>IAAEKNSTIVFPLPIDMLQGIIG</u>	280

Fig. 3. Sequence Alignment of C-terminal Amino Acids for Stomatins Orthologs

Abbreviations are as follows: PH1511 (from *P. horikoshii*), PAB1933 (*P. abyssi*), PA0452 (*Pseudomonas aeruginosa*), SMB20989 (*Sinorhizobium meliloti*), MEC-2 (*Caenorhabditis elegans*), and stomatin (human). White lettering boxed with a black background indicates residues that are conserved in all sequences, and bold lettering indicates similar residues. A filled arrowhead shows proteolytic cleavage site of PH1511p by the 1510-N protease. Underlined residues of human stomatin are crucial for oligomerization.

3).

興味深い点としてこの多量体形成に関与する領域 (234 NVIVLMLPM 242) 中に 1510-N プロテアーゼによる切断部位が存在する。1510-N プロテアーゼは、PH1511p の Leu-238 と Met-239 の間で特異的に切断する (234 NVIVL↓MLPM 242)。11) またヒトのストマチンにおいて、Ile-266, Val-267, Phe-268 の 3 つ

の残基が生体膜との相互作用に必須であるとの報告もある。8) PH1511p においては、Ile-236, Val-237, Leu-238 がそれらの残基に相当する。これらの 3 つの残基は 1510-N プロテアーゼによる切断部位のすぐ前の残基である。高次の多量体を形成すると考えられるストマチン PH1511p は、1510-N プロテアーゼにより切断を受けると、生体膜上の多量体が解離し、その構造変化がなんらかの情報伝達に関与するのではないかと予想される。

5. おわりに

本総説では、ストマチン PH1511p のコアダメイン PhSto^{CD} の三次元構造を中心とし、その特異的切断プロテアーゼ 1510-N との関連について紹介した。ストマチンの三次元構造を初めて決定できたため、これらのタンパク質の機能解明の手がかりが得られたと考えている。しかし決定した PhSto^{CD} の結晶構造は、1510-N プロテアーゼによる切断部位を含んでいないことから、PH1511p の多量体構造ではなく、むしろ 1510-N による切断後の構造であ

ると考えられる。今後、1510-Nによる切断部位を含めたストマチン PH1511p の多量体構造を決定することができれば、ストマチンの本質的な機能の解明につながると期待できる。

最近、真核生物の巨大核酸-タンパク質複合体である vault の三次元構造が X 線結晶構造解析により決定された。¹⁷⁾ vault は分子量が約 1000 万で多剤耐性や自然免疫への関与が報告されているが本質的な機能は明らかになっていない。興味深いことに、この vault の肩ドメインの構造がストマチン PhSto^{CD} の構造と類似していた。vault が脂質ラフトへ集合する現象が報告されていることから¹⁸⁾両者の機能的な関連に興味を持たれる。

謝辞 本研究は、産業技術総合研究所の松井郁夫博士との共同研究で行われたものです。本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を賜りました松井博士には心より感謝申し上げます。さらにご懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部の藤井敏教授に謝意を表します。また構造解析を行うにあたりご助言を頂きました産業技術総合研究所の原田一明博士、秋葉俊彦博士、並びに、X 線回折強度データの収集を行う際お世話になりましたつくば高エネルギー加速器研究機構のスタッフの皆様にご感謝いたします。最後に、貴重なご助言とご協力を頂いた産業技術総合研究所の松井研究室の皆様、静岡県立大学薬学部の教室員の皆様にご礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Stewart G. W., Argent A. C., Dash B. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1225**, 15–25 (1993).
- 2) Green J. B., Fricke B., Chetty M. C., von Düring M., Preston G. F., Stewart G. W., *Blood Cells, Mol. Dis.*, **32**, 411–422 (2004).
- 3) Price M. P., Thompson R. J., Eshcol J. O., Wemmie J. A., Benson C. J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 53886–53891 (2004).
- 4) Wetzel C., Hu J., Riethmacher D., Benckendorff A., Harder L., Eilers A., Moshourab R., Kozlenkov A., Labuz D., Caspani O., Erdmann B., Machelska H., Heppenstall P. A., Lewin G. R., *Nature (London)*, **445**, 206–209 (2007).
- 5) Goodman M. B., Ernstrom G. G., Chelur D. S., O'Hagan R., Yao C. A., Chalfie M., *Nature (London)*, **415**, 1039–1042 (2002).
- 6) Snyers L., Umlauf E., Prohaska R., *FEBS Lett.*, **449**, 101–104 (1999).
- 7) Snyers L., Umlauf E., Prohaska R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 17221–17226 (1998).
- 8) Umlauf E., Mairhofer M., Prohaska R., *J. Biol. Chem.*, **281**, 23349–23356 (2006).
- 9) Tavernarakis N., Driscoll M., Kyripides N. C., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 425–427 (1999).
- 10) Yokoyama H., Fujii S., Matsui I., *J. Mol. Biol.*, **376**, 868–878 (2008).
- 11) Yokoyama H., Matsui I., *J. Biol. Chem.*, **280**, 6588–6594 (2005).
- 12) Yokoyama H., Matsui E., Akiba T., Harata K., Matsui I., *J. Mol. Biol.*, **358**, 1152–1164 (2006).
- 13) Glebov O. O., Bright N. A., Nichols B. J., *Nat. Cell Biol.*, **8**, 46–54 (2006).
- 14) Langhorst M. F., Reuter A., Jaeger F. A., Wippich F. M., Luxenhofer G., Plattner H., Stuermer C. A., *Eur. J. Cell Biol.*, **87**, 211–226 (2008).
- 15) Salzer U., Zhu R., Luten M., Isobe H., Pastushenko V., Perkmann T., Hinterdorfer P., Bosman G. J., *Transfusion*, **48**, 451–462 (2008).
- 16) Hájek P., Chomyn A., Attardi G., *J. Biol. Chem.*, **282**, 5670–5681 (2007).
- 17) Tanaka H., Kato K., Yamashita E., Sumizawa T., Zhou Y., Yao M., Iwasaki K., Yoshimura M., Tsukihara T., *Science*, **323**, 384–388 (2009).
- 18) Kowalski M. P., Dubouix-Bourandy A., Bajmoczy M., Golan D. E., Zaidi T., Coutinho-Sledge Y. S., Gygi M. P., Gygi S. P., Wiemer E. A., Pier G. B., *Science*, **317**, 130–132 (2007).