

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解  
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

## 神経軸索の伸長を司るガイダンス因子セマフォリンの シグナル伝達における過渡的複合体形成

禾 晃 和<sup>1,\*</sup>, 高 木 淳 一<sup>1</sup>

細胞表面受容体の多くは、過渡的とも言える弱い相互作用を巧みに利用することで、細胞外からのシグナルを細胞内へと伝えている。神経軸索の伸長を制御するセマフォリンとプレキシシンも、そのような準安定的な分子間相互作用によってシグナル伝達を制御しているリガンドと受容体のペアであることが、筆者らの研究から明らかになった。一連の構造解析から、シグナル伝達前のプレキシシンは、非常に弱い相互作用によってホモ二量体構造をとっている一方、シグナル伝達時には会合状態が劇的に変化し、セマフォリンとの間でヘテロ四量体構造を形成する可能性が示された。細胞外におけるプレキシシンの会合状態の変化は「てこの原理」によって細胞内へと伝わり、シグナル伝達の引き金になるものと考えられる。本稿では、過渡的な分子間相互作用の姿が結晶解析によって明らかになった一例として、セマフォリンとプレキシシンの構造研究を紹介する。

### はじめに

ヒトなど高等生物には高度に発達した神経回路が張り巡らされ、種々の情報伝達が行われている。神経回路を構成する個々の神経細胞は、軸索と呼ばれる“手”を伸ばして、標的となる他の神経細胞の樹状突起と相互作用している。神経回路が正常に機能するためには、神経細胞同士が正しい組み合わせで“手”をつなぐことが重要であり、発生・分化の過程で軸索は誘引されたり反発を受けたりしてナビ

ゲーションされて所定の「接続」を果たす。誘因や反発を引き起こすのは、軸索の周りに細胞外可溶性分子として、あるいは別の細胞上に膜タンパク質として存在する様々な分子群で、ガイダンス因子と呼ばれ、誘因因子 (attractant) と忌避因子 (repellant) がある。本稿で取り上げるセマフォリンは、最も有名なガイダンス因子の一つである<sup>1)</sup>。セマフォリンの中で神経軸索の忌避因子として最初に同定されたセマフォリン 3A は、細胞外へと分泌される可溶性のタンパク質であったが<sup>2)</sup>、その後、セマフォリン 3A と相同な細胞外領域を持つ膜貫通型のホモログも多数見つかった<sup>3-7)</sup>。それらホモログのドメイン構成は多種多様であるが、いずれもアミノ末端領域に“セマ (sema) ドメイン”と呼ばれる相同な領域を持つという点は共通している。これまで見つかっているセマフォリンファミリーは八つのクラスに分類され、このうち1と2は無脊椎動物に、そして3から7は脊椎動物に存在し、残りの一つはウィルスがコードするホモログである<sup>8)</sup>。それぞれのクラスはさらに複数のメンバーからなり、たとえばヒトではクラス3~7で合計21種類のセマフォリンを持つ。セマフォリンの受容体としては、ニューロピリンとプレキシシンというまった

<sup>1</sup> 大阪大学蛋白質研究所プロテオミクス総合研究センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2)

\*現所属：横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)

Transient signalling complex formed by axon guidance cue semaphorin

Terukazu Nogi<sup>1,\*</sup> and Junichi Takagi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Research Center for Structural and Functional Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka 3-2, Suita, Osaka 565-0871, Japan; \*Current address: Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Suehirocho 1-7-29, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan)

く異なる2種類のI型膜タンパク質が知られている<sup>8)</sup>。セマフォリンの多様性に合わせて、受容体側にも多くの種類があり、ほ乳類はニューロピリンを二つ(ニューロピリン1と2)、プレキシンについては四つ(A~D型)持ち、しかもプレキシンはサブタイプを合わせるとヒトでは9種類存在する<sup>8)</sup>。基本的にはあるセマフォリンは特定の型のプレキシンによって認識されており、細胞や組織に依存して、特定のセマフォリンとプレキシンのペアのみがシグナル伝達を行うことができる。上述のセマフォリン3Aでは、ニューロン上のA型プレキシンが忌避性シグナルを伝達することが知られている<sup>9)</sup>。ところがセマフォリン3Aに対する細胞上の高親和性受容体はプレキシンでなくニューロピリン1である<sup>10~13)</sup>。セマフォリン3AはニューロピリンとA型プレキシンが細胞上で形成する特殊な複合体を介して細胞内へシグナルを伝えるという考えが提唱されているが<sup>14)</sup>、その分子メカニズムはよくわかっていない。いずれにしろ、この補助受容体としてのニューロピリン要求性はすべてのセマフォリンに共通ではなく、セマフォリン6Aを含む多くのセマフォリンはニューロピリン非依存的にプレキシンと直接相互作用し、単独でシグナル伝達を行うことができる<sup>15)</sup>。プレキシンの1200アミノ酸にも及ぶ大きな細胞外領域は複数のドメインからなるモジュラー構造をしているが、個々のモジュールは実はリガンドであるセマフォリンと共通点が多く、たとえばプレキシンのアミノ末端にもセマドメインが存在する。また、セマドメインのカルボキシル末端側には、Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) ドメインと呼ばれる小型のドメインがあるが、その名が示す通り、このドメインはセマフォリンの細胞外領域にも存在している。一方、プレキシンの細胞質側の領域にはGTPase-Activating Protein (GAP) ドメインが存在し、このドメインが細胞内でのシグナル伝達を制御していると考えられている<sup>16)</sup>。

セマフォリンは、軸索伸長の反発因子として発見されたものであるが、その後の研究から、血管新生や心臓形成、免疫系の活性化、骨代謝など、様々な生命現象に関与することが続々と明らかになっている<sup>17~21)</sup>。これらの知見は、セマフォリンシグナルが、ヒトなど多細胞生物の形態形成と機能維持において重要なシグナル伝達系であることを示している。実際、このセマフォリンシグナルの異常ががん<sup>8)</sup>や自己免疫疾患<sup>22,23)</sup>などにも関わっていることが分かっており、セマフォリンシグナルの作用機序の解明と、それに基づくシグナル伝達の制御は医学的にも重要な課題であると言える。

セマフォリンシグナルに関わる分子群のうち、すでにセマフォリンやニューロピリンに関しては細胞外領域の構造研究が進んでいた<sup>24~28)</sup>。その一方で、プレキシンに関しては、細胞質領域の構造は報告されていたものの<sup>29,30)</sup>、セマ

フォリンとの相互作用に関与する細胞外領域の構造は報告されていなかった。このため、シグナル伝達時にセマフォリンが受容体とどのようなストイキオメトリーおよびコンフォーメーションで結合するのか、そしてセマフォリンとプレキシンの相互作用が如何にして細胞内シグナル伝達へと結びつくのかということは全くもって不明であった。そこで筆者らは、セマフォリンとプレキシンのファミリーの中からセマフォリン6AとプレキシンA2のペアを取り上げ、構造解析を行うこととした。セマフォリン6Aは、無脊椎動物型のクラス1セマフォリンと相同性が高く、また、ニューロピリン非依存的にプレキシンに結合してシグナル伝達を行うことから、脊椎動物が持つセマフォリンのプロトタイプとも考えられる分子である<sup>6)</sup>。筆者らは、セマフォリン6Aとその受容体プレキシンA2を、セマフォリンシグナルの伝達機構を理解するためのモデルとして捉え、X線結晶構造解析に取り組んだ<sup>31)</sup>。

### 1. セマフォリン6A細胞外領域の結晶構造

シグナル伝達機構を理解するためには、受容体とリガンドがシグナル伝達の前後でどのような構造変化を起こすかを調べるのが重要である。そこで、筆者らは、まずシグナル伝達前の状態の情報を得るため、受容体とリガンドそれぞれ単独での構造解析に取り組むこととした。リガンドとして働くセマフォリン6AはI型の膜タンパク質であり、細胞外領域にセマドメインとPSIドメインを一つずつ持つ。細胞外領域にはPSIドメインに続いてリンカー様の領域があり、さらに膜貫通領域へとつながっている(図1a)。本研究では、これらのドメインのうち、アミノ末端に存在するセマドメインからPSIドメインまでの550残基の領域を可溶性断片として発現させることとした。膜タンパク質の細胞外領域には、分泌タンパク質と同様に、糖鎖修飾やジスルフィド結合など様々な翻訳後修飾が施される。一次構造の解析から、セマフォリン6Aのセマドメインにも六つのN型糖鎖修飾部位があり、また多数のジスルフィド結合が形成されていることが予想された。本研究では、出来るだけ天然状態に近い構造をとったタンパク質を発現させるために、動物由来の培養細胞を発現系として用いることとした。また、付加される糖鎖の化学構造が不均一であると良質の結晶が得られない可能性もあるので、化学構造が整ったN型糖鎖が付加されるよう、糖鎖修飾系に変異をもつ細胞株CHO lec3.2.8.1株<sup>32)</sup>を用いて発現を行った。培養上清に分泌されたセマフォリン6Aの細胞外領域断片をアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって単離精製し結晶化を行った結果、最終的に2.5Å分解能で構造を決定するに至った(図1b)。

セマフォリン6A細胞外断片のうち、アミノ末端に存在

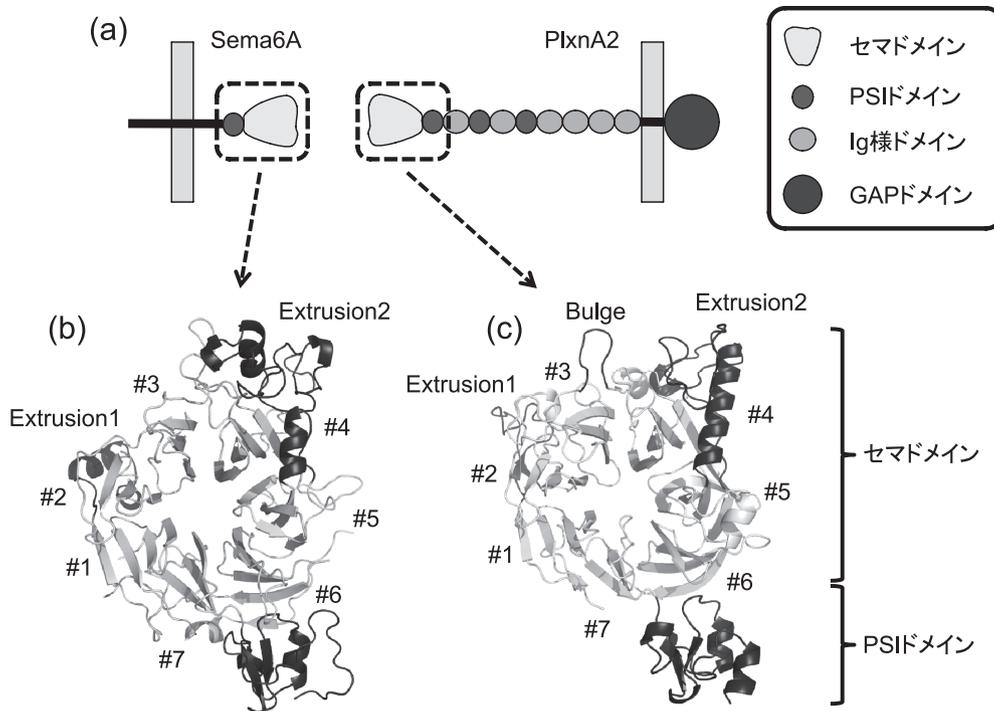


図1 セマフォリン 6A とプレキシン A2 のドメイン構成と結晶構造

(a) セマフォリン 6A とプレキシン A2 は、ともにモジュラー状の細胞外領域を持ち、いずれも N 末端にセマドメインと PSI ドメインを有する。受容体であるプレキシン A2 の細胞質側には GAP ドメインがあり、細胞内シグナル伝達を制御していると考えられる。(b) セマフォリン 6A の細胞外領域断片の結晶構造。セマドメインと PSI ドメインを含む。セマドメインは 7 枚の羽根からなる  $\beta$ -プロペラー構造 (灰色のリボン図で示した。また、各ブレードの横に番号をふった。) をとっており、Extrusion1, 2 (黒色) という二つの特徴的な挿入領域を持つ。PSI ドメイン (黒色) は小型の球状ドメインであり、プロペラーの 6 枚目の羽根の側面に位置している。(c) プレキシン A2 の細胞外領域断片の結晶構造。セマフォリン 6A と基本構造はよく似ており、Extrusion1, 2 に加えて Bulge ループ (黒色) と呼ぶ挿入領域がある。

するセマドメインは、7 枚の羽根 ( $\beta$  シート) からなる  $\beta$ -プロペラー構造を取っていた。そして、1 枚目と 2 枚目の羽根の間と 5 枚目の羽根の内部には、非常に長い挿入ループが 2 カ所あることも分かった (これらをそれぞれ Extrusion1, 2 領域と呼ぶ)。上述のようにセマドメインには 6 カ所の N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列があるが、これらのうち 5 カ所については Asn 残基の側鎖に続く電子密度が観測され、糖が付加されていることが確かめられた。残りの 1 カ所 (Asn-49) についてはディスオーダーしているループ領域の内部に存在していたため、電子密度から糖鎖の有無を判別することは出来なかった。しかしながら、ループの可動性が高いこと自体が糖鎖修飾の存在を強く示唆しているものと思われ、この部位にも糖鎖は結合しているものと思われる。セマドメインに続く PSI ドメインは 50 残基ほどの非常に短いドメインであるが、三つのジスルフィド結合によって結びつけられた、コンパクトな球状の構造をとっていた。PSI ドメインはプロペラーの 6 枚目の羽根の側面に位置し、セマドメインと密に相互作用して

いた。

セマフォリン 6A の結晶解析では、比較的多くの結晶化条件が見つかり、三つの異なる条件から、構造決定可能な分解能の回折データが得られた。それら三つの条件の結晶は異なる空間群に属していたが、すべて非対称単位と呼ばれる独立領域にセマフォリン 6A の二量体を含んでおり、それらの二量体の構造は三つの条件でほぼ一致していることが分かった。上述のようにセマフォリン 6A のセマドメインは、 $\beta$ -プロペラー構造をとっている。そして、結晶内で見つかった二量体では、そのセマドメインがプロペラーの面と面を合わせるように配置しており、いわば「Face-to-face」型の二量体を形成していた (図 2a)。我々がセマフォリン 6A の解析を行う以前、同じセマフォリンファミリーに属するセマフォリン 3A<sup>25)</sup> と 4D<sup>24)</sup> の細胞外断片の結晶構造が決定されていたが、これら他のクラスのセマフォリンについても、今回我々が決定したものとよく似た「Face-to-face」型の二量体構造が結晶中で形成されていた。元々配列が相同なセマフォリン分子同士が同じような配置の二量

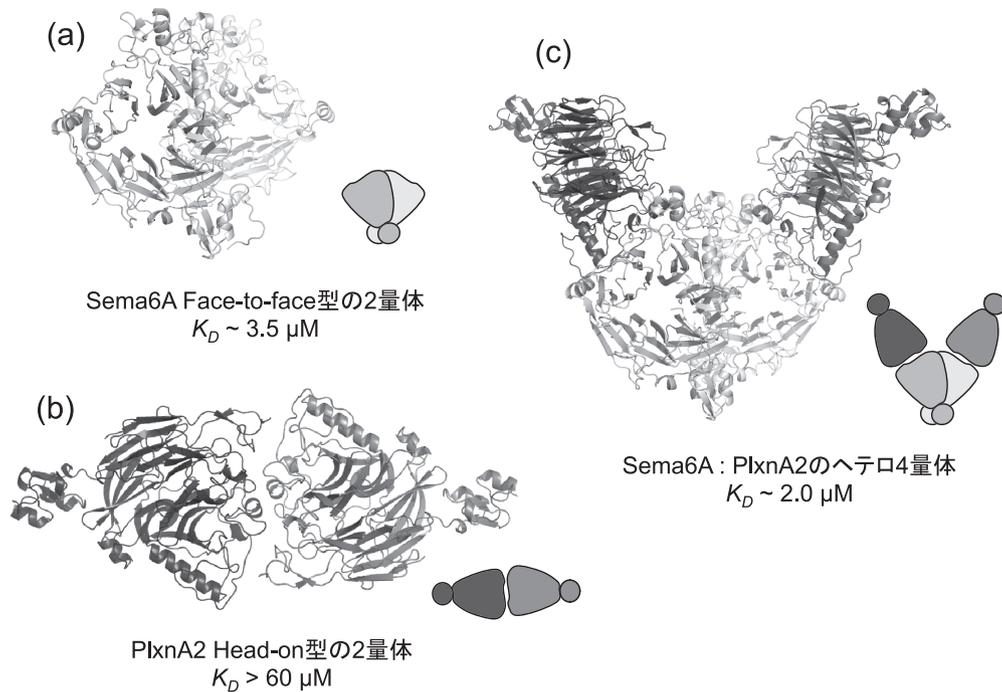


図2 結晶構造で見られたセマフォリン 6A とプレキシシン A2 のホモ二量体構造とシグナル伝達複合体の結晶構造

(a) セマフォリン 6A の細胞外領域は、 $\beta$ -プロペラーの面と面を介して、「Face-to-face」型のホモ二量体構造を形成する。(b) シグナル伝達前のプレキシシン A2 の細胞外領域は、 $\beta$ -プロペラーの側面を介して「Head-on」型のホモ二量体構造を形成すると予想される。(c) シグナル伝達時のプレキシシン A2 は、セマフォリン 6A との間で 2 : 2 のヘテロ四量体を形成する。それぞれの会合体の解離定数を図中に示した。

体構造をとることは何ら不思議なことではないと受け止められるかもしれない。しかしながら、配列が相同なセマフォリンファミリーの間で、この二量体化に関わる領域は決して相同性が高い訳ではなく、またインターフェースを形成する相互作用の質（水素結合、イオン結合、疎水性相互作用などの使われ方）も全く異なっている。これらの知見は、セマフォリンファミリーがホモ二量体構造をとるという選択圧の元に進化してきたことを示しているとも考えられる。セマフォリンファミリーの分子が、共通の性質とする「Face-to-face」型のコンフォーメーションは、セマフォリンの生理的な機能と密接な関係があるものと考えられる。そこで、筆者らは次に示すような機能解析を行うこととした。

## 2. 「Face-to-face」型のホモ二量体構造をとったセマフォリンがプレキシシンを活性化する

「Face-to-face」型のコンフォーメーションと生理的機能の関連を考える場合、これがプレキシシンを活性化の際のコンフォーメーションであるという可能性がまず考えられる。しかしながら、セマフォリン 3A を解析したグループは、受容体活性化時にはセマフォリンは二量体から単量体へと解離し、プレキシシンと結合するという説を提唱してい

た<sup>25)</sup>。実際に、セマフォリン 6A に関しても、二量体化の親和性はそれほど高くなく、超遠心分析で二量体化の解離定数を見積もったところ  $3.5 \mu\text{M}$  となることが分かった。そこで筆者らは、単量体と二量体のいずれが活性型の構造であるかを調べるため、二量体を固定化する変異体を作製し、野生型との間で受容体活性化能を比較することとした。

セマフォリン 6A の二量体の固定化は、分子間ジスルフィド結合の導入によって行った。結晶構造に基づいて二量体のインターフェースを調べたところ、互いの Met-415 が近接した位置にあることが分かったので、これを Cys に置換した変異体を作製した。すると M415C 変異体は予想通り分子間ジスルフィド結合による安定な共有結合性二量体を形成した。次に培養細胞にプレキシシンを発現させ、これにセマフォリン 6A 細胞外断片の野生型と二量体化変異体を添加した。これはコラプスアッセイと呼ばれる実験で、受容体プレキシシンを介して、セマフォリン 6A のシグナルが伝わると、細胞骨格に変化が生じ細胞は収縮する(図 3a)。野生型と M415C 変異体の両方について、濃度を変化させてプレキシシン発現細胞に添加すると、野生型では添加した可溶性断片の終濃度が  $\mu\text{M}$  を越えなければ細胞の収縮が見られなかった一方で、M415C 変異体では 2 桁低

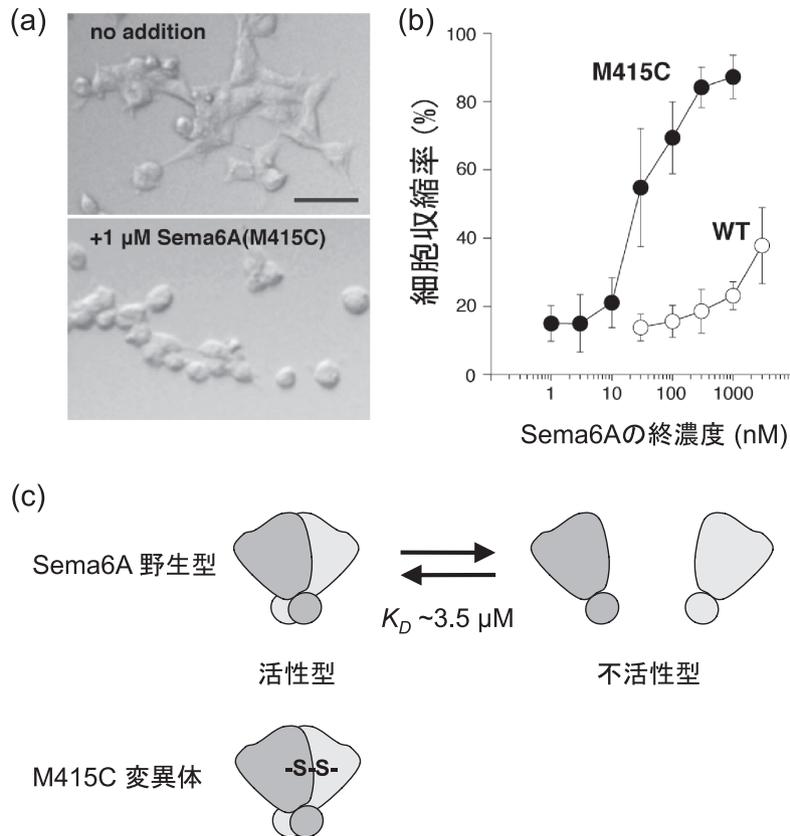


図3 二量体化変異体を用いたコラプスアッセイ

(a) プレキシシ発現細胞に活性型のセマフォリンを添加すると細胞収縮が見られる。(b) セマフォリンの添加量と細胞収縮率の関係。二量体化変異体(M415C)は、野生型に比べて2桁低い濃度でも細胞収縮が見られた。(c) 野生型及び二量体化変異体の溶液内での会合状態。野生型の解離定数は $\sim 3.5 \mu\text{M}$ で単量体と二量体の平衡状態にあるため、低濃度の条件では単量体に解離し不活性型になるものと考えられる。一方、M415C変異体は、分子間ジスルフィド結合によって活性型のコンフォーメーションに固定されているため、低濃度の条件でも細胞収縮活性を示す。

い10 nM オーダーの添加量でも細胞収縮が見られた(図3b)。上述のように野生型のセマフォリン6A断片は、解離定数 $3.5 \mu\text{M}$ で単量体と二量体の平衡状態にあることが分かっており、受容体の活性化に必要な濃度と解離定数の間に高い相関が見られる。M415C変異体では二量体構造が保たれているため低濃度の条件でも活性を示す一方、野生型では添加量が少ない場合、二量体から単量体に解離してしまい、結果として活性が低下するということがアッセイの結果は示しているものと考えられる(図3c)。以上のことから筆者らは、セマフォリンファミリーで共通する「Face-to-face」型の二量体構造は、プレキシシ受容体を活性化するためのコンフォーメーションであると結論付けた。

### 3. プレキシシのセマドメインもホモ二量体構造を形成する

筆者らは続いて、受容体であるプレキシシA2についても単独での構造解析に着手した。プレキシシA2もセマフォリン6Aと同様にI型の膜タンパク質であり、非常に長いモジュラー状の細胞外領域を有する(図1a)。アミノ末端には、セマフォリンと同じように、まずセマドメインがあり、その後ろにPSIドメインとイムノグロブリン様(Ig-like)ドメインが交互に3回繰り返された後、さらにIg-likeドメインが3個連結されている。本研究では、セマフォリンと結合する領域の構造情報を得るため、プレキシシA2についてもセマドメインとPSIドメインを一つ含む領域までを可溶性断片として発現させ、構造決定を行うこととした。セマフォリン6Aと同様に、糖鎖修飾系に変異を持つ動物細胞(HEK-293 GnTI-株)<sup>33)</sup>を用いてタンパク質

を発現させ、結晶解析を行った結果、最終的に2.1 Å分解能で構造を決定することが出来た(図1c)。プレキシシ A2断片の構造は、配列相同性からも予想された通り、セマフォリン6Aの構造と非常によく似ていた。セマドメインは7枚の羽根からなるβ-プロペラー構造をとり、やはり1枚目と2枚目の羽根の間、そして、5枚目の羽根の内部に長いExtrusion領域を有する。ただし、これらのExtrusion領域のコンフォーメーションは、セマフォリン6Aのものとは大きく異なっており、よく似たβ-プロペラー構造の中であってセマフォリンとプレキシシの違いを際立たせている。そして、さらにもう一つセマフォリンの構造と異なる点として、プレキシシ A2には3枚目の羽根の内部にも特徴的なループ領域があり、プロペラー構造の外に大きく突き出した構造をとっていた(以降、このループをBulgeループと呼ぶ)。

プレキシシ A2単独での構造解析から得られた情報の中で、最も予想外であったことは、プレキシシ A2のセマドメインも二量体構造をとるということであった。プレキシシファミリーに関しては、細胞内に存在するGAPドメインが二量体化するという説はこれまでも提唱されていたが、細胞外においてセマドメインを介して二量体化するという報告はこれまで無かった。我々の解析した結晶では、結晶格子の非対称単位内に2分子のプレキシシ A2断片が存在しており、それらは2回対称によって関係付く配置をとっていた。そして、このプレキシシ A2の二量体構造は、セマフォリンファミリーで見られる「Face-to-face」型とは全く異なるものであった。結晶格子内の2分子のプレキシシ A2は、プロペラーの側面を向かい合わせて、あたかも頭突きしたかのような「Head-on」型の二量体構造を形成していた(図2b)。この二量体化のインターフェースは、二つのExtrusion領域とプロペラーの側面が作る比較的平坦な分子表面であった。そして、先に述べたプレキシシ A2に特徴的なBulgeループが、この二量体化の相互作用において重要な役割を担っていることも分かった。Bulgeループはインターフェースの中心に位置して、結合パートナーの分子表面のくぼみに深くはまり込んでいた。Bulgeループの先端には保存されたAsp-220とPhe-221があるが、それぞれ静電的相互作用と疎水性相互作用を形成し、結合の安定化に寄与していた。

結晶解析によって予想外なホモ二量体構造が見つかったことから、この二量体形成が細胞膜上でも起こりうるものかどうか考えてみた。プレキシシ A2のセマドメインが「Head-on」型の二量体構造をとる場合、二つの分子のカルボキシル末端は、互いに反対側に向くことになる。プレキシシは膜タンパク質であり、同じ細胞上に発現している分子の間のcisの二量体形成を考えると、互いのカルボキシル末端が真反対に位置することは、膜に対するトポロジー

の観点から望ましくないように思える。しかしながら、プレキシシの細胞外領域には複数のPSIドメインとIg-likeドメインがモジュラー状に連なっているため(図1a)、この領域が折れ曲がって膜貫通領域へとつながっているとすれば、膜近傍ではカルボキシル末端同士が同じ向きに並ぶことが可能である。また、このホモ二量体化のインターフェースの表面積を計算すると、約1,700 Å<sup>2</sup>と見積もられ、生理的に意味のあるタンパク質間相互作用面の目安とされる表面積の範囲(1,200-2,000 Å<sup>2</sup>)<sup>30</sup>に入っていることも分かった。さらに、このプレキシシ A2の細胞外断片を用いて超遠心分析を行い、溶液状態で多量体化が見られるかどうかの検討も行った。沈降平衡法によって解析した結果、濃度依存的な分子量の増加が見られ、二量体化の傾向があることが確かめられた。しかしながら、親和性は極めて低く、解離定数は少なく見積もっても60 μM以上と算出された。可溶性タンパク質同士の親和性を議論する場合、解離定数が数十μMの相互作用というのは非常に弱く、生理的にはほとんど意味のないものと見なされることが多い。しかしながら、このプレキシシ A2のセマドメインは3次元拡散をする可溶性タンパク質ではなく、膜上に固定されているタンパク質の一部である。2次元にしか拡散せず、また膜面からの高さも制限された膜タンパク質の細胞外ドメイン同士であれば、非常に低い親和性でも特異的な相互作用を形成する可能性は十分にあると考えられる。以上のことから判断し、筆者らは結晶中で見出されたプレキシシ A2細胞外断片の二量体構造は、膜上での生理的な状態を反映した構造である可能性が高いという結論に至った。

#### 4. セマフォリンとプレキシシは、2:2のヘテロ四量体の複合体を形成する

セマフォリン6Aとプレキシシ A2、それぞれ単独での構造解析に続いて、二つのタンパク質のシグナル伝達状態の構造を調べるべく、複合体の結晶解析に取り組んだ。二量体化変異体を用いた活性測定から、セマフォリン6Aは複合体においても「Face-to-face型」の二量体構造をとることが予想されるが、プレキシシ A2がどのようなコンフォーメーションでセマフォリン6Aに結合するのかは全くもって不明である。プレキシシ A2も「Head-on」型の二量体構造を保ったままセマフォリン6Aに結合する可能性もあるだろうし、二量体から単量体に解離して結合する可能性もある。また、単量体に解離するとすれば、どのような量比でセマフォリン6Aと結合するのかということも問題となる。

タンパク質分子同士の複合体を結晶化させる場合、二者が安定な複合体を形成するならば、クロマトグラフィーなどの分離操作で複合体のみを単離して結晶化の方が望ま

しい。しかしながら、セマフォリン6AとプレキシシンA2のヘテロフィリックな相互作用も解離定数は2  $\mu$ M前後と見積もられており、結合はそれほど強くない。また、セマフォリン6Aの「Face-to-face型」の二量体も解離・会合の平衡状態にあるため、ゲルろ過クロマトグラフィーなどカラム操作によって複合体を分画することは非常に困難であった。そこで、本研究では、分離操作は行わず、二者を単純に混合するだけで結晶化条件の探索を行った。その結果、セマフォリン6AとプレキシシンA2をモル比1:1で混合した条件で、再現良く複合体結晶が得られる条件が見つかり、最終的に3.6 Å分解能で構造を決定するに至った。

構造解析の結果、セマフォリン6AとプレキシシンA2は2:2のヘテロ四量体構造を形成することが明らかになった(図2c)。セマフォリン6Aは予想通り、「Face-to-face」型の二量体構造を保持しており、このコンフォーメーションが活性型、すなわちシグナル伝達型であることが改めて確かめられた。ところがそれとは対照的に、プレキシシンA2は単量体に解離し、1分子ずつ独立にセマフォリン6Aの二量体に結合していた。その相互作用面を見ても、プレキシシンA2は、「Head-on」型のホモ二量体形成の時と同じ、 $\beta$ -プロペラーの側面を用いてセマフォリン6Aに結合しており、あたかもプレキシシンA2同士のホモフィリックな結合から、セマフォリン6Aとのヘテロフィリックな結合へと結合相手を交換しているかのようにも見えた。このプレキシシンA2の相互作用面は、前述のように、二つのExtrusion領域と $\beta$ -プロペラーの側面が形成する平坦な分子表面であり、Bulgeループはこのヘテロフィリックな相互作用においても中心的な役割を担っていた。すなわちAsp-220とPhe-221が、セマフォリン6Aとの結合においてもそれぞれ静電的相互作用と疎水性相互作用に関わり、結合の安定化に寄与していた。一方、セマフォリン6A側のプレキシシン結合面としては、ちょうどプレキシシンのそれと相同な領域、すなわちExtrusion領域とプロペラーの側面が作る平坦な分子表面が使われていた。当然ながら、このヘテロ相互作用面とホモ(Face-to-face)相互作用面は完全に独立で、分子表面で別々の領域に位置していた。前述のように、セマフォリンとプレキシシンにはそれぞれ複数のクラスが存在し、特異的に相互作用するものの組み合わせは決まっている。Extrusion領域は、セマフォリンとプレキシシンの個性を際立たせている領域だと上で述べたが、それと同時に、セマフォリンとプレキシシンの結合特異性を決定している領域であるとも考えられる。

##### 5. 2:2のヘテロ四量体構造は細胞膜上でのシグナル伝達複合体の構造を反映している

筆者らは、結晶構造において見出された相互作用が細胞膜上での相互作用を反映したのかを検証するため、細胞

を用いた結合実験に取り組んだ。この実験では、アルカリフォスファターゼ(AP)融合タンパク質として発現・精製したセマフォリン6Aをプレキシシン発現細胞に添加し、APの発色反応を利用して結合量を評価した。前述のように、セマフォリン6Aはホモ二量体構造を保持した状態でプレキシシンと相互作用し活性化を行うが、その一方で細胞外断片のホモ二量体化の親和性はそれほど高くない。そのため、セマフォリン6Aの細胞外領域断片を低濃度で添加する場合、容易に単量体に解離してしまい、プレキシシンとの結合が検出出来ない可能性もあった。しかしながら、都合が良いことに、融合させたAPは安定なホモ二量体として存在するタンパク質であるため<sup>35)</sup>、セマフォリン6Aの二量体構造も同時に安定化され、低濃度で添加した条件でもプレキシシンA2と相互作用することが可能となった。セマフォリンとプレキシシンの両方について変異体を作製し結合実験を行った結果、静電的相互作用に関与する残基を逆の電荷を持つものに変異させたものや、相互作用面に糖鎖修飾を導入した変異体については、結合が弱まることが確かめられた。特に、セマフォリン6AのLys-393とプレキシシンA2のAsp-193の間に形成された塩橋を破壊した変異体の相互作用解析では興味深い知見が得られた。セマフォリン6AのLys-393をGluに置き換えた変異体(K393E)とプレキシシンA2のAsp-193をLysに置き換えた変異体(D193K)を作製し結合実験を行ったところ、セマフォリン6AかプレキシシンA2のいずれか一方のみを変異体にした組み合わせでは結合が見られなかったものの、K393E変異体とD193K変異体を組み合わせたものについては再び結合が見られるようになった(図4)。この結果は、一方のみが変異体の場合は電荷の反発が起きてしまうが、二つの変異体を組み合わせた場合は塩橋が形成され、親和性が回復したことを意味していると考えられる。これらの知見から、Lys-393とAsp-193の間に形成されている塩橋が複合体の安定化に大きく寄与していることが示唆される。

また、我々は同様のアッセイ系を利用することで、シグナル伝達におけるニューロピリンの役割を検証するための実験を行った。前述のように、セマフォリン6Aとは異なり、セマフォリン3Aはプレキシシンへの結合と活性化のために共受容体であるニューロピリンを必要とする。我々はセマフォリン3Aに関してもAP融合タンパク質を調製し、まず、脊髄後根神経節ニューロンを用いたコラプスアッセイによって、受容体の活性化能の評価を行った。その結果、プレキシシンとの相互作用部位と予想される残基に変異を導入したセマフォリン3Aはシグナル伝達活性が著しく低下することが分かり、セマフォリン3Aがセマフォリン6Aと同じインターフェースを用いて、プレキシシンと相互作用していることが確かめられた(図5a)。またこれと並行して、ニューロピリン発現細胞に対して、セマフォリン

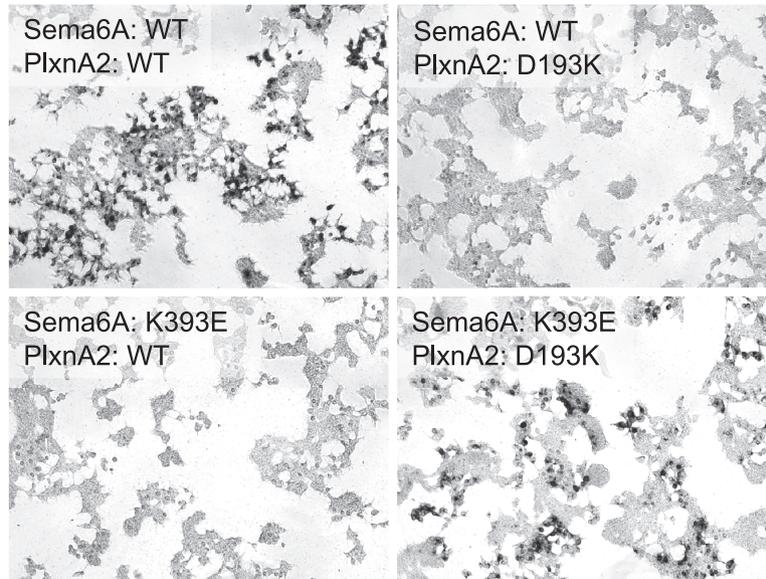


図4 プレキシシン A2 発現細胞を用いたセマフォリン 6A の結合実験

セマフォリン 6A の K393E 変異体とプレキシシン A2 の D193K 変異体を作成し結合実験を行った。プレキシシン A2 を発現させた HEK293T 細胞に、セマフォリン 6A-AP 融合タンパク質を結合させた後、AP の発色反応を利用して結合の有無を比較した。セマフォリン 6A とプレキシシン A2 のいずれか一方のみが変異体の組合せでは結合が見られないが、両方とも変異体の組合せでは、野生型同士の場合と同様、結合が見られた。

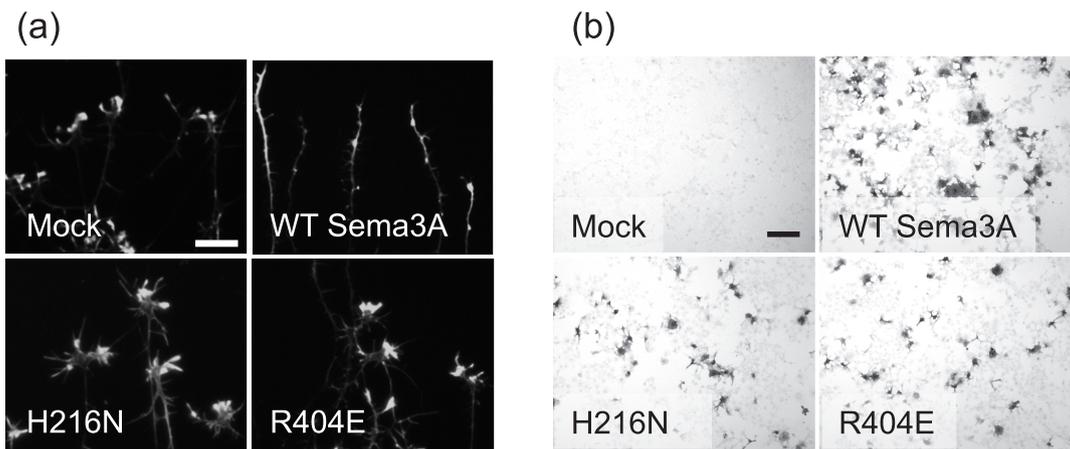


図5 セマフォリン 3A 変異体を用いたコラプスアッセイと結合実験

(a) 脊髄後根神経節ニューロンを用いたコラプスアッセイ。セマフォリン 6A との構造比較から、プレキシシン結合部位と予想される残基に変異を導入したところ、野生型セマフォリン 3A で見られた成長円錐の崩壊が見られなくなった。(b) ニューロピリン 1 発現細胞を用いた結合実験。COS-7 細胞にニューロピリン 1 を発現させ、セマフォリン 3A-AP 融合タンパク質を結合させた。コラプスアッセイでシグナル伝達活性が見られなくなったセマフォリン 3A 変異体も、野生型と同様にニューロピリン 1 には結合することが分かった。

3A-AP 融合タンパク質を添加して、ニューロピリンへの結合アッセイを行った。すると、プレキシシンの活性化能を失ったと判定された変異体についても結合が見られ、ニューロピリンへの結合能は低下していないことが明らかになった (図 5b)。これらの結果は、セマフォリン 3A の変異体はニューロン上のニューロピリンには結合出来るに

もかわらず、シグナル伝達活性を失っていることを意味している。ニューロピリンはあくまで、セマフォリン 3A 分子を膜近傍に誘導する役割を担っているのみであり、ニューロピリン自体にはシグナル伝達活性は無いことが、筆者らのアッセイによって確かめられたとも言える。恐らく、ニューロピリンは、プレキシシンとの親和性が低いセマ

フォリン 3A を近くに引き寄せ、プレキシンに対して提示する役割を担っているのだろうと思われる。

### 6. セマフォリンは、「てこの原理」によってプレキシンを活性化する

一連の構造解析の結果から、プレキシン受容体は、単独

では「Head-on型」のホモ二量体構造をとっており、セマフォリンと遭遇することで2:2のヘテロ四量体構造をとるという可能性が示された。これら二つの状態の間で、プレキシンのセマドメインの「向き」は大きく変化しており、細胞質側に連結されたGAPドメインの配置も「てこの原理」によって大きく変化するものと考えられる。現状では

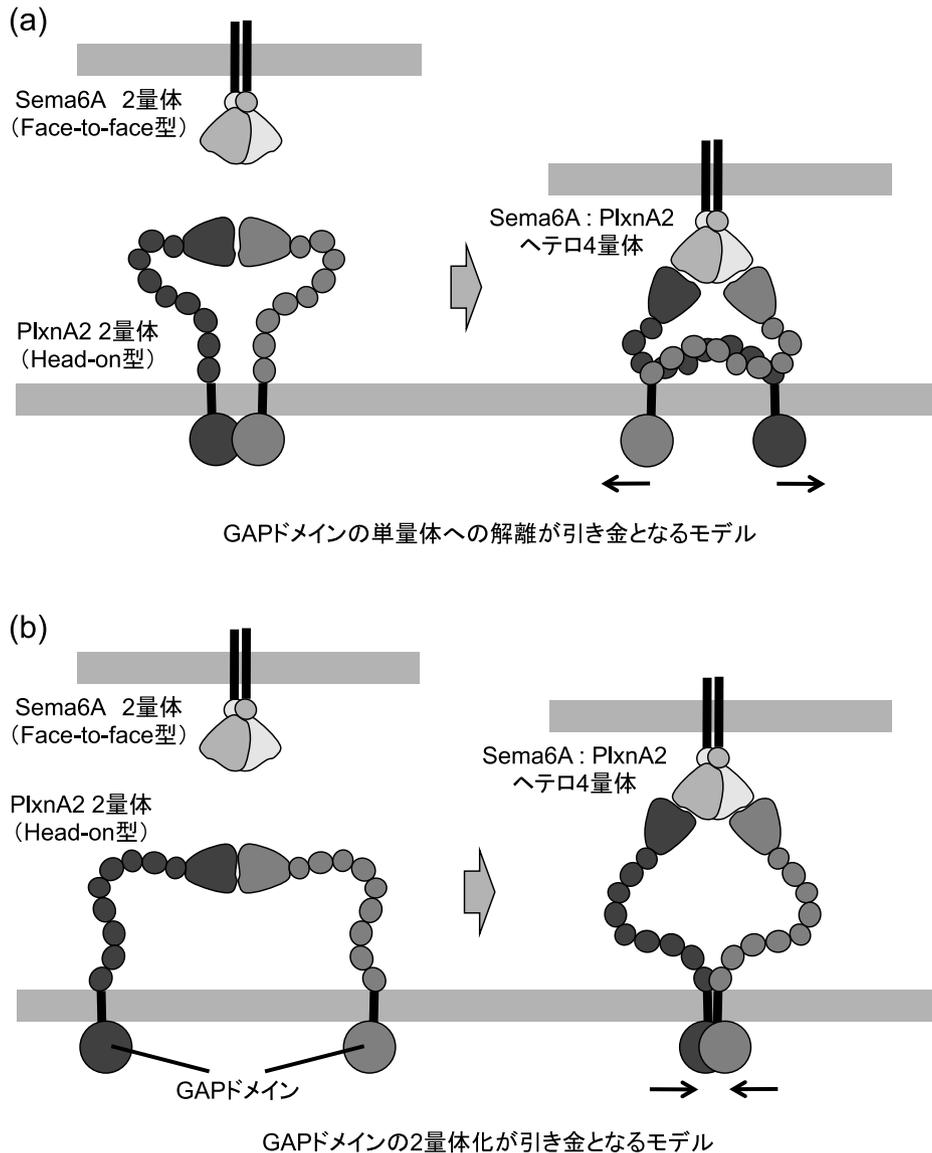


図6 結晶構造から導き出されたプレキシンの活性化モデル

プレキシン A2 同士の「Head-on」型のホモ二量体構造からセマフォリン 6A とのヘテロ四量体構造へと変化する過程で、膜上でのプレキシン分子の向きは大きく変化する。この分子の向きの変化が「てこの原理」によって細胞質側に伝わり、GAPドメインの活性化を引き起こすと考えられる。GAPドメインの活性化機構に関しては、次の二つのモデルが想定される。(a) シグナル伝達前はホモ二量体化している GAPドメインが、単量体へと引き離されることによって活性化が起きるというモデル。(b) シグナル伝達前は引き離され単量体として存在している GAPドメインが、構造変化によって近くに引き寄せられることによって活性化が起きるというモデル。どちらのモデルが正しいかを検証するためには、セマドメインと GAPドメインをつないでいるストーク(茎)状の領域の構造を調べることが重要であると考えられる。

細胞質領域の構造変化の詳細は不明であるが、元々二量体化していた GAP ドメインが単量体に引き裂かれる (図 6a), もしくは、元々離れていた二つの GAP ドメインが近くに引き寄せられて二量体化する (図 6b) というモデルが想定される。実際、プレキシンの GAP ドメインの構造解析からも同じような活性化モデルが提唱されている。これまでプレキシンの A3<sup>29)</sup> と B1<sup>30)</sup> については、細胞内の GAP ドメインの立体構造がすでに決定されている。そして、それらの構造を決定したグループも GAP ドメインの単量体と二量体との会合状態の変化が GAP 活性を調節しているということを主張している。複合体形成の過程で、GAP ドメインの会合状態がどのように変化しているかを明らかにするためには、プレキシンの巨大な I 型膜タンパク質分子の全体構造を明らかにする必要がある。特に、セマドメインと GAP ドメインをつなぐストーク状の領域がどのような形をしているのかを明らかにすることが、GAP ドメイン活性化機構の全容を理解する上で重要であると考えられる。

### 終わりに

結晶構造、とくに結晶中で観察された分子間相互作用はアーティファクトであり、タンパク質本来の姿を反映していないという批判をしばしば受ける。しかしながら、結晶化したことによって初めて、タンパク質機能の新たな一面が明らかになることもあると筆者らは考える。本稿で取り上げた低親和性のタンパク質複合体の結晶解析はその良い例であり、希薄溶液を用いた相互作用解析では検出できない「過渡的な」会合体の姿が、結晶解析を行うことによって初めて明らかになったとも言える。本研究で解析したセマフォリンとプレキシンのそれぞれのホモ二量体構造、そして、二者のヘテロ四量体構造はすべて、 $\mu\text{M}$  以上の大きな解離定数を示す非常に弱い相互作用によって成り立っていた。特にプレキシンのホモ二量体形成の親和性は低く、構造解析を行う以前は、このような相互作用があることすら知られていなかった。このような親和性は、3次元に拡散する可溶性タンパク質同士の相互作用であるならば、ほとんど生理的に無意味と見なされる程度のものである。しかしながら、本研究で取り上げたセマフォリンやプレキシンは細胞膜の2次元平面上に拘束された状態で存在している分子であり、実際に生体内で働いている時には、この程度の親和性でも十分に特異的で「意味のある」相互作用になるものと考えられる。そして、セマフォリンとプレキシンは、非常に弱い相互作用で結合と解離を行うが故に、迅速にシグナルを伝えることも出来るのだろうし、また逆に、迅速にシグナル伝達を停止させることも出来るのだろうと思われる。そもそも、セマフォリンによる忌避シグナルは、シグナルを伝えた後には細胞同士が離れることを前提

としており、つまりはリガンドと受容体もいつまでも結合しては具合がわるい。さらに、ここで示した未刺激時のプレキシンのホモ二量体も、常に結合と解離をくり返す弱いものだからこそセマフォリンが近づいてきたときにヘテロ相互作用に切り替えることが可能なのであり、安定な二量体ではそもそもリガンド認識すらできないことになる。セマフォリンとプレキシンのペアに限らず、細胞表面受容体とその細胞外リガンドが非常に弱い相互作用で結合している例は多い。リガンドと受容体の結合が「過渡的」とも言える弱い相互作用で成り立っていることは、アナログで微弱な状態変化をシグナル伝達の ON-OFF というデジタル信号に変換するために、そしてそれを制御する経路を何重にも保持するために、極めてふさわしい性質と言えるのかもしれない。

### 文 献

- 1) Tamagnone, L. & Comoglio, P.M. (2004) *EMBO Rep.*, 5, 356-361.
- 2) Luo, Y., Raible, D., & Raper, J.A. (1993) *Cell*, 75, 217-227.
- 3) Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., & Goodman, C.S. (1993) *Cell*, 75, 1389-1399.
- 4) Puschel, A.W., Adams, R.H., & Betz, H. (1995) *Neuron*, 14, 941-948.
- 5) Adams, R.H., Betz, H., & Puschel, A.W. (1996) *Mech. Dev.*, 57, 33-45.
- 6) Zhou, L., White, F.A., Lentz, S.I., Wright, D.E., Fisher, D.A., & Snider, W.D. (1997) *Mol. Cell. Neurosci.*, 9, 26-41.
- 7) Xu, X., Ng, S., Wu, Z.L., Nguyen, D., Homburger, S., Seidel-Dugan, C., Ebens, A., & Luo, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 22428-22434.
- 8) Neufeld, G. & Kessler, O. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, 8, 632-645.
- 9) Fiore, R. & Puschel, A.W. (2003) *Front Biosci.*, 8, s484-499.
- 10) Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., & Fujisawa, H. (1997) *Neuron*, 19, 995-1005.
- 11) He, Z. & Tessier-Lavigne, M. (1997) *Cell*, 90, 739-751.
- 12) Feiner, L., Koppel, A.M., Kobayashi, H., & Raper, J.A. (1997) *Neuron*, 19, 539-545.
- 13) Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., & Ginty, D.D. (1997) *Cell*, 90, 753-762.
- 14) Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., & Strittmatter, S.M. (1999) *Cell*, 99, 59-69.
- 15) Suto, F., Ito, K., Uemura, M., Shimizu, M., Shinkawa, Y., Sanbo, M., Shinoda, T., Tsuboi, M., Takashima, S., Yagi, T., & Fujisawa, H. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 3628-3637.
- 16) Pasterkamp, R.J. (2005) *Trends Cell Biol.*, 15, 61-64.
- 17) Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D.V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Kolodkin, A.L., & Ginty, D. D. (2005) *Science*, 307, 265-268.
- 18) Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., Hori, M., & Kikutani, H. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 1204-1211.
- 19) Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N.,

- Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H., & Kikutani, H. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 435–447.
- 20) Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Maki-no, N., Takamatsu, H., Takegahara, N., Suto, F., Hori, M., Fujisawa, H., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2008) *Dev. Biol.*, **321**, 251–262.
- 21) Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2006) *Nat. Cell. Biol.*, **8**, 615–622.
- 22) Kumanogoh, A., Shikina, T., Watanabe, C., Takegahara, N., Suzuki, K., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Prasad, D.V., Mizui, M., Toyofuku, T., Tamura, M., Watanabe, D., Parnes, J.R., & Kikutani, H. (2005) *Int. Immunol.*, **17**, 1277–1282.
- 23) Wang, X., Kumanogoh, A., Watanabe, C., Shi, W., Yoshida, K., & Kikutani, H. (2001) *Blood*, **97**, 3498–3504.
- 24) Love, C.A., Harlos, K., Mavaddat, N., Davis, S.J., Stuart, D.I., Jones, E.Y., & Esnouf, R.M. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 843–848.
- 25) Antipenko, A., Himanen, J.P., van Leyen, K., Nardi-Dei, V., Lesniak, J., Barton, W.A., Rajashankar, K.R., Lu, M., Hoemme, C., Puschel, A.W., & Nikolov, D.B. (2003) *Neuron*, **39**, 589–598.
- 26) Vander Kooi, C.W., Jusino, M.A., Perman, B., Neau, D.B., Bellamy, H.D., & Leahy, D.J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 6152–6157.
- 27) Lee, C.C., Kreusch, A., McMullan, D., Ng, K., & Spraggon, G. (2003) *Structure*, **11**, 99–108.
- 28) Appleton, B.A., Wu, P., Maloney, J., Yin, J., Liang, W.C., Stawicki, S., Mortara, K., Bowman, K.K., Elliott, J.M., Desma-rais, W., Bazan, J.F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A. W., Wu, Y., Watts, R.J., & Wiesmann, C. (2007) *Embo J.*, **26**, 4902–4912.
- 29) He, H., Yang, T., Terman, J.R., & Zhang, X. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 15610–15615.
- 30) Tong, Y., Hota, P.K., Penachioni, J.Y., Hamaneh, M.B., Kim, S., Alviani, R.S., Shen, L., He, H., Tempel, W., Tamagnone, L., Park, H.W., & Buck, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 35962–35972.
- 31) Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A., & Takagi, J. (2010) *Nature*, **467**, 1123–1127.
- 32) Stanley, P. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 377–383.
- 33) Reeves, P.J., Callewaert, N., Contreras, R., & Khorana, H.G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 13419–13424.
- 34) Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 2177–2198.
- 35) Le Du, M.H., Stigbrand, T., Taussig, M.J., Menez, A., & Stura, E.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 9158–9165.
-