

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07886

研究課題名(和文)天然変性蛋白質PQBP1のスプライシング調節機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the splicing regulatory function of an intrinsically disordered protein PQBP1

研究代表者

水口 峰之(Mineyuki, Mizuguchi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：30332662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PQBP1は小さく折りたたまれたWWドメインと長大な天然変性領域から構成される。PQBP1はスプライシング因子WBP11やスプライソソーム構成因子U5-15kDに結合する。PQBP1のC末端領域に位置するYxxPxxVLモチーフがU5-15kDの疎水性表面に結合することがわかっている。本研究では、PQBP1のN末端側に位置するWWドメインがWBP11に結合すると、PQBP1のYxxPxxVLモチーフとU5-15kDの結合親和性が低下することを示した。さらに、U5-15kDにU5-52Kが結合すると、U5-15kDとPQBP1の結合親和性が増加することも示された。

研究成果の概要(英文)：PQBP1 is composed of a small folded WW domain and a large disordered region. PQBP1 binds to a splicing factor WBP11 and a spliceosomal protein U5-15kD. The hydrophobic area of U5-15kD interacts with the YxxPxxVL motif located in the C-terminal region of PQBP1. In this study, we have shown that the interaction between PQBP1 and U5-15kD is attenuated by the binding of the N-terminal WW domain of PQBP1 to WBP11. Our results also showed that the interaction between U5-15kD and U5-52K strengthens the interaction between U5-15kD and PQBP1.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：タンパク質 天然変性タンパク質 相互作用 アロステリック効果

1. 研究開始当初の背景

Polyglutamine-tract binding protein 1 (PQBP1)は、WW ドメインを有する 265 アミノ酸残基のタンパク質である。WW ドメインの C 末端側は天然変性領域であり、特定の構造をとっていない。PQBP1 は中枢神経系で多く発現しており、その遺伝子変異は知的障害の原因となる。また、PQBP1 は核内に多く存在しており、転写やスプライシングを調節する機能を有する。核内において、PQBP1 はスプライソソーム構成因子の U5-15kD に結合することがわかっている。また、U5-15kD の酵母オルソログである Dim1/Dib1/Snu16 はスプライシングに必須のタンパク質である。近年我々は、PQBP1 の C 末端領域と U5-15kD の複合体の立体構造を明らかにし、PQBP1 の YxxPxxVL モチーフが U5-15kD との結合に必須であることを明らかにした (Mizuguchi *et al.*, *Nat Commun.* 2014;5:3822.)。一方、PQBP1 の N 末端側に位置する WW ドメインは、スプライシング因子 WBP11 や歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の原因タンパク質 atrophin-1 に結合する。

2. 研究の目的

PQBP1 がスプライソソーム構成因子である U5-15kD と結合する際に、WBP11 や U5-52K など他のスプライシング調節因子が、PQBP1 と U5-15kD との結合にどのような影響を与えるのかについて調べ、PQBP1 のスプライシング調節機能についての知見を得る。

3. 研究の方法

すべてのタンパク質は大腸菌の発現系を用いて得た。WBP11 の N 末端には、His-tag と可溶性タグの Lipoyl ドメイン (LD) を付加した。一方、PQBP1 と U5-15kD (4-137 残基) には、N 末端に His-tag のみを付加した。また、U5-15kD(4-137)については、N 末端側に His-tag と biotinylation-tag を付加した融合タンパク質も準備し、biotinylation-tag に含まれるリシン残基を biotin-protein ligase を用いてビオチン化した。PQBP1 の C 末端 43 残基である PQBP1-CT43 の N 末端側に His-tag と biotinylation-tag と LD を付加した融合タンパク質 (LD-PQBP1-CT43) も準備し、同様にビオチン化した。タンパク質の精製は、Ni-NTA

樹脂を用いたアフィニティー精製とゲルろ過クロマトグラフィーで行った。

ビオチン化タンパク質は、CM5 センサーチップ上のストレプトアビジンに固定化した。表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験は、25°C, pH 8.5, 流速 30 μ L/min の条件で行った。装置は BIACORE J を用いた。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定は、Bruker Avance 800 MHz NMR 装置 (高感度クライオプローブ付) を用いて行った。N 末端に His タグを付加した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 U5-15kD(4-137)は、 ^{15}N 塩化アンモニウムと ^{13}C グルコースを含む最小培地で大腸菌を培養することで得た。U5-15kD(4-137)の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC, CBCANH, CBCA(CO)NH を 310K で測定し主鎖連鎖帰属を行った。

4. 研究成果

PQBP1 は小さく折りたたまれた WW ドメインと YxxPxxVL モチーフを含む長大な天然変性領域からなり、スプライシング調節因子 WBP11 やスプライソソーム構成因子 U5-15kD に結合する。WBP11 に結合する WW ドメインは PQBP1 の N 末端側に位置し、U5-15kD に結合する YxxPxxVL モチーフは PQBP1 の C 末端領域に位置している。本研究では、PQBP1 の N 末端側に位置する WW ドメインと WBP11 との結合が、PQBP1 の C 末端側の YxxPxxVL モチーフと U5-15kD との結合にどのような影響を与えるのかについて調べた。PQBP1 の濃度を 30 μ M (または 60 μ M) に固定し、WBP11 の濃度を 0 ~ 200 μ M にした混合溶液を準備した。この混合溶液を U5-15kD を固定化したセンサーチップに対してインジェクションし、SPR シグナルを観測した。WBP11 が存在しないとき、つまり 30 μ M の PQBP1 のみが存在する溶液をインジェクションした場合、SPR シグナルは 660 RU (resonance unit)であり、60 μ M の PQBP1 が存在する溶液の場合では SPR シグナルは 30 μ M のときの 2 倍になった。これらの条件での SPR シグナルの上昇は、PQBP1 が U5-15kD に結合したことを示している。一方、PQBP1 と WBP11 の混合液をインジェクションした場合には、WBP11 の濃度が上昇するにつれて、PQBP1 の濃度が一定であるにも関わらず、SPR シグナルは減少した。このような SPR シ

グナルの減少は、PQBP1 と U5-15kD の結合親和性が低下したことを示している。さらに、WBP11 に結合しない PQBP1 変異体を用いて同様の実験を行ったところ、結合親和性の低下は観測されなかった。

NMR を用いた実験では、PQBP1 存在下において ^{15}N 標識 U5-15kD の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。PQBP1 が存在しない条件でも U5-15kD の HSQC を測定し、スペクトルの変化を調べた。PQBP1 が存在する条件では、U5-15kD の V81 と I90 のシグナルがブロードニングしてシグナル強度が著しく減少した。U5-15kD の V81 と I90 は PQBP1 結合表面の近くに位置していることから、V81 と I90 に由来するシグナルのブロードニングは、PQBP1 と U5-15kD の結合を反映している。一方、PQBP1 と WBP11 が存在する条件で U5-15kD の HSQC スペクトルを測定した場合には、V81 と I90 に由来するシグナル強度の大部分が回復した。SPR と NMR の結果から、我々は PQBP1 と WBP11 の結合は PQBP1 と U5-15kD の結合を負に調節すると結論づけた。

PQBP1 の YxxPxxVL モチーフは U5-15kD の疎水性表面に結合し、両者の結合は主に疎水性相互作用により安定化されることがわかっている (Mizuguchi *et al.*, *Nat Commun.* 2014;5:3822.)。しかし、U5-15kD の疎水性表面の周辺には極性のアミノ酸残基も存在しているため、疎水性相互作用に加えて静電的相互作用や水素結合が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで本研究では、U5-15kD の分子表面に存在する極性アミノ酸をアラニンに変異させ、PQBP1 と U5-15kD 変異体との結合を SPR で調べた。調べた U5-15kD 変異体は、D15A, E22A, E50A, D68A, K71A, E74A, K88A, H89A, E117A, R121A の 10 種類である。解離定数を比較した結果、U5-15kD の疎水性表面の周辺に位置する D68, E74, H89 が PQBP1 との結合に重要であることが分かった (表 1)。

さらに、PQBP1 の P244A, Y245F, Y245V, P246A, S247A, G249A, G249V, V251L, V251F, L252V, L252F を作成し、U5-15kD との結合を調べた。その結果、PQBP1 の Y245, P246, P248, G249, V251, L252 が U5-15kD との結合に特に重要であることが示された (表 2)。

Table 1. The dissociation constant (K_d) between the U5-15kD mutants and PQBP1. LD-PQBP1-CT43 is immobilized on sensor chip surfaces.

U5-15kD	K_d (μM)
Wild-type	36.5 \pm 9.2
D15A	28.4 \pm 1.2
E22A	46.0 \pm 3.3
E50A	47.2 \pm 0.6
D68A	201.2 \pm 9.9
K71A	59.1 \pm 3.1
E74A	176.8 \pm 29.4
K88A	57.3 \pm 5.0
H89A	Nobinding
E117A	41.6 \pm 3.9
R121A	68.6 \pm 6.8

Table 2. The dissociation constant (K_d) between the PQBP1 mutants and U5-15kD. U5-15kD is immobilized on sensor chip surfaces.

PQBP1-CT43	K_d (μM)
Wild-type	27.4 \pm 2.0
P244A	39.6 \pm 3.7
Y245F	>250
Y245V	No binding
P246A	>250
S247A	74.1 \pm 8.1
G249A	>250
G249V	No binding
V251L	No binding
V251F	No binding
L252V	No binding
L252F	No binding

U5-15kD は PQBP1 以外に U5-52K と結合することが知られており、PQBP1 と U5-52K は U5-15kD の異なる表面に非競合的に結合することが分かっている (Mizuguchi *et al.*, *Nat Commun.* 2014;5:3822.)。本研究では、U5-52K が PQBP1 と U5-15kD の結合に与える影響についても調べた。U5-15kD(4-137)の C 末端に、U5-52K の GYF ドメイン (U5-52K-GYF) を連結した融合タンパク質 (U5-15kD-U5-52K) を準備し、PQBP1 の C 末端 43 残基である PQBP1-CT43 との結合を評価した。その結果、U5-15kD-U5-52K と PQBP1 の解離定数は、U5-15kD と PQBP1 の解離定数の 1/15 であっ

た(表3)。一方、U5-52K-GYFとPQBP1は結合しなかった。以上の結果は、U5-15kDにU5-52Kが結合すると、U5-15kDとPQBP1の結合親和性が増加することを強く示唆している。

Table 3. The K_d values of U5-15kD-U5-52K, U5-15kD, and U5-52K-GYF. LD-PQBP1-CT43 is immobilized on sensor chip surfaces.

Proteins	K_d (μ M)
U5-15kD-U5-52K	2.3 \pm 0.3
U5-15kD	36.5 \pm 9.2
U5-52K-GYF	No binding

以上の結果から、PQBP1とU5-15kDの結合親和性はWBP11存在下では減少し、逆にU5-52K存在下では増加することが示された。つまり、PQBP1とスプライソソーム構成因子U5-15kDの結合は、WBP11やU5-52Kによって調節されており、これらのタンパク質間相互作用がスプライソソームの形成に影響を与えていると思われる。

スプライソソームは多数のタンパク質と数種類のRNAからなる複合体であり、mRNA前駆体からイントロンを取り除いて成熟RNAにするスプライシングを実行する。本研究では、スプライソソームのコアタンパク質であるU5-15kDとPQBP1について研究を行ったが、U5-15kDとPQBP1との結合はWBP11やU5-52Kによって調節されることが示された。スプライソソームには最大で40~80種類のタンパク質が含まれるため、スプライソソームについて理解するためには、スプライソソームを構成する他のタンパク質間相互作用についても詳細に解析を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mizuguchi M, Obita T, Kajiyama A, Kozakai Y, Nakai T, Nabeshima Y, Okazawa H. Allosteric modulation of the binding affinity between PQBP1 and the spliceosomal protein U5-15kD. *FEBS Lett.* 2016; 590 (14): 2221-2231. doi: 10.1002/1873-3468.12256. (査読有)

水口 峰之. PQBP1 遺伝子のフレームシフト変異はスプライシング因子 U5-15kD への結合を阻害する. *生化学*. 2015; 87 (4): 478-480. (査読無)

〔学会発表〕(計3件)

水口峰之、NMRを用いた凝集性タンパク質の解析、平成27年度日本分光学会NMR分光部会、2015年9月30日、名古屋

Mizuguchi M, Nabeshima Y, Obita T, Okazawa H. Interaction of spliceosomal proteins PQBP1, U5-15kD, and WBP11. The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems; 2016 Aug 15-26; Kyoto.

Nakai T, Obita T, Mizuguchi M. Weak interaction between the RNA-binding domains of hnRNP F and the spliceosomal protein U5-15kD. The first international symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 峰之 (MIZUGUCHI, Mineyuki)
富山大学・大学院医学薬学研究部
(薬学)・教授
研究者番号: 30332662

(2) 研究分担者

帯田 孝之 (OBITA, Takayuki)
富山大学・大学院医学薬学研究部
(薬学)・准教授
研究者番号: 30578696

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし