

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790034

研究課題名（和文）天然変性蛋白質 PQBP1 のセグメントラベルと NMR による分子認識機構の解明

研究課題名（英文）Segmental labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1 and elucidation of the molecular recognition mechanism by NMR

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

研究成果の概要（和文）：Expressed Protein ligation (EPL)法を PQBP1 に適用し、C 末端ドメインが ^{15}N 標識されたセグメントラベル体を作成することに成功した。コールドショックベクターを用いて、2 つの PQBP1 フラグメントを大腸菌で高発現させ、これらを EPL 法によって連結した。本研究の成果は、他の天然変性蛋白質のセグメントラベルに適用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We successfully prepared segmentally labeled PQBP1, in which the C-terminal domain is ^{15}N -labeled. Two fragments of PQBP1 were highly expressed in *E. coli* with the cold-shock vector, and ligated by the expressed protein ligation method. Our results will be applicable to the segmental labeling of other intrinsically disordered proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生体分子，蛋白質，分子認識，NMR

1. 研究開始当初の背景

天然変性蛋白質は、転写・翻訳、細胞周期、シグナル伝達など生体内で重要な機能を担っている場合が多い。天然変性蛋白質の多くは、ターゲット分子（他の蛋白質分子や DNA など）を認識することで機能する。ターゲット分子に結合すると、多くの天然変性蛋白質は大きく揺らいだ状態から特異的な立体構造へとフォールディングする。これまで天然変性蛋白質は、核磁気共鳴（NMR）法を用いて研究されてきた。これは、NMR が disorder 領域と order 領域の両方を観測できるからである。これまでに報告された研究の多くは、

天然変性蛋白質のドメインを断片化して立体構造解析を行っている。しかしながら、断片化によって蛋白質は不安定化する可能性があり、そのような場合には断片化した蛋白質は全長の立体構造を反映していない。したがって、天然変性蛋白質の立体構造や機能について研究するには、蛋白質を断片化せずに解析する必要がある。ところが、断片化しないで NMR スペクトルを測定すると disorder 領域のシグナルが重なってしまうため解析が非常に困難となる。

上述した実験的な困難を克服するために、本研究では、近年に開発されたセグメントラ

ベル（蛋白質分子の観測したいセグメントだけを安定同位体で標識する方法）を天然変性蛋白質に適用した。セグメントラベル法は、これまで高分子量蛋白質の立体構造解析で威力を発揮してきた (Vitali, F., *et al.*, *EMBO J.* **25**, 150-162, 2006)。この方法では、蛋白質スプライシングの機能を有するインテインを利用し、安定同位体標識したフラグメントと非標識のフラグメントを連結させる (図 1)。これにより、天然変性蛋白質を断片化することなく、観測したいセグメントだけを NMR で解析することができる。

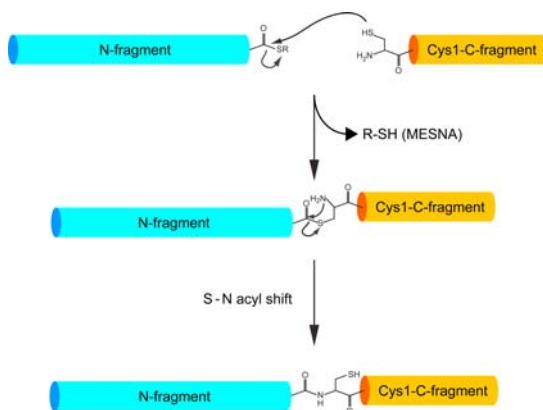


図 1. Expressed Protein Ligation の概略. 別々に発現・精製した N-fragment と Cys1-C-fragment を連結する反応. 連結反応は、N-fragment のチオエステル化された C 末端に Cys1-C-fragment の Cys が反応することによって起こる。最終的には、S-N アシルシフトによって N-fragment と Cys1-C-fragment がペプチド結合によって連結される。

本研究では天然変性蛋白質の PQBP1 について研究した。PQBP1 は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) やスプライソソームの機能を調節する核内蛋白質である。PQBP1 は WW ドメイン (WWD) と C 末端ドメイン (CTD) を有しており、Pol II には WWD が、スプライソソームの U5-15kD には CTD が結合する。また、PQBP1 は極性ドメイン (PRD) を介して変異型 ataxin-1 のポリグルタミン鎖に結合する。

2. 研究の目的

PQBP1 の PRD と CTD は disorder 領域であることがわかっている。本研究では、Expressed Protein Ligation (EPL)法によって、PQBP1 の CTD セグメントを安定同位体標識する (図 1)。これにより、全長 PQBP1 の CTD が、断片化したときと同じ特徴を示すのかどうかを調べることができる。また、CTD が

U5-15kD に結合したときの立体構造変化について、PQBP1 を断片化しないで調べることが可能となる。

3. 研究の方法

PQBP1 の 1-219 残基をコードする DNA の 3'側に Mxe GyrA INTEIN と chitin-binding domain (CBD) の DNA を連結した。この DNA をコールドショックベクターの pCold I に挿入し発現ベクターを得た。発現ベクターで大腸菌 C43(DE3)を形質転換し、37°C で振とう培養した。600 nm の OD が 0.4~0.5 になった時点で培養液を 15°C に冷却し、終濃度が 0.5 mM となるように IPTG を加え、15°C で 24 時間培養した。大腸菌を超音波破碎した後、PQBP1(1-219)-INTEIN-CBD を含む可溶性画分を Chitin Beads に加えた。Chitin Beads をカラムに入れ、20 mM HEPES, 500 mM NaCl (pH 8.0)を十分量流した。その後、50 mM MESNA (sodium 2-sulfanylethane sulfonate)を含む 20 mM HEPES, 500 mM NaCl (pH 8.0)を加えた。これにより、融合蛋白質から INTEIN-CBD が切断され、C 末端がチオエステル化された PQBP1(1-219)を得ることができた。これを N-fragment とした (図 2)。

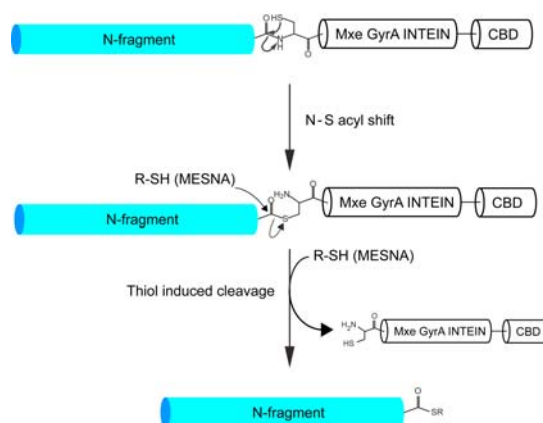


図 2. N-fragment の生成. N-fragment と連結している INTEIN-CBD は、還元剤の MESNA によって切り離される。N-fragment の C 末端はチオエステル化される。

PQBP1 の 220-265 残基のフラグメントに Gly220Cys 変異を導入した。このフラグメントをコードする DNA の 5'側に CBD と SSF DnaB INTEIN の DNA を連結した。PQBP1(1-219)の場合と同様に、連結した DNA を pCold I ベクターに挿入し発現ベクターを得た。CBD-INTEIN-PQBP1(220-265)は、発現ベクターで形質転換した BL21(DE3)を ¹⁵N 標識 CHL 培地で培養して発現させた。大腸菌を超音波破碎した後、可溶性画分を Chitin Beads に加えて CBD-INTEIN-PQBP1(220-265)

を結合させた。Chitin Beads をカラムに入れ、20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (20°C, pH 8.5) を十分量流した。その後、100 mM DTT (dithiothreitol)を含む 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (4°C, pH 8.5)を加えて融合蛋白質から CBD-INTEIN を切断し、N 末端が Cys の PQBP1(220-265)を得た。これを 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)に対して透析した。これを Cys1-C-fragment とした (図 3)。

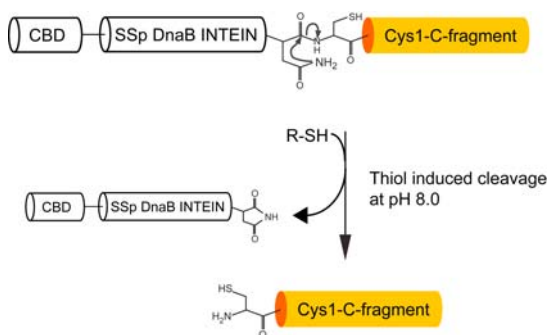


図 3. Cys1-C-fragment の生成. Cys1-C-fragment と連結している CBD-INTEIN は、DTT によって切り離される。

EPL 反応は、Cys1-C-fragment と N-fragment を 10:1 のモル比で混合し 37°C で行った。混合直後の濃度は、Cys1-C-fragment が 0.31 mM、N-fragment が 0.031 mM である。この混合溶液を 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)に対して 37°C で透析し、16.5 時間反応させた。反応後に終濃度が 10 mM になるように DTT を加え、37°C で 2 時間インキュベーションした。SDS-PAGE、逆相 HPLC、MALDI-TOF-MS によって EPL 反応後のサンプルを分析した。

4. 研究成果

インテインを利用したセグメントラベル法は、さまざまな方法が提案されているが、反応効率等を考慮し、本研究では EPL 法を採用した (Vitali, F., *et al.*, *EMBO J.* **25**, 150-162, 2006)。

EPL 法では、別々に発現・精製した 2 本のフラグメント (N-fragment と Cys1-C-fragment) を連結させる。チオエステル化された N-fragment の C 末端と、Cys1-C-fragment の N 末端が連結される (図 1)。我々は、SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS を用いて、N-fragment と Cys1-C-fragment が連結されたことを確認した。

本研究では、N-fragment と Cys1-C-fragment を大量に得るために、コールドショックベクターを用いた。INTEIN, CBD, PQBP1 フラグ

メントの融合タンパク質は、可溶性画分に大量に発現されることがわかった。これにより、mg オーダーのサンプルを必要とする NMR に適用することができた。

我々は、N-fragment と Cys1-C-fragment が高効率で連結される反応条件を探索した。いくつかの条件を比較した結果、N-fragment と Cys1-C-fragment を 1:10 のモル比で混合する場合に、連結された全長 PQBP1 が最も多く得られた。また、我々は EPL 反応の溶液条件についても検討した。その結果、PQBP1 のセグメントラベルには、20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)が最適であることがわかった。本研究の成果は、他の天然変性蛋白質のセグメントラベルに適用できると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yokoyama, T., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Kusaka, K., Yamada, T., Hosoya, T., Ohhara, T., Kurihara, K., Tomoyori, K., Tanaka, I. and Niimura, N. Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: neutron crystal structure of human transthyretin. *J Struct Biol.* 177: 283-290 (2012). (査読有)
- ② 水口峰之, 岡澤均. 天然変性タンパク質 PQBP-1 の揺らぎと生体機能. メディカルバイオ. 10 月号別冊「揺らぎと生体機能」 pp.44-48, オーム社 東京 (2010). (査読無)
- ③ Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa H. and Kawano, K. Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* 1804: 1500-1507 (2010). (査読有)
- ④ Kouno, T., Mizuguchi, M., Aizawa, T., Shinoda, H., Demura, M., Kawabata, S. and Kawano, K. A novel β -defensin structure: big defensin changes its N-terminal structure to associate with the target membrane. *Biochemistry* 48: 7629-7635 (2009). (査読有)
- ⑤ Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa, H. and Kawano, K. Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. *Biochim Biophys Acta.* 1794: 936-943 (2009). (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 水口峰之, ポリグルタミン結合タンパク質の構造生物学的研究. 日本薬学会第132年会, 2012年3月29日, 札幌.
- ② Mizuguchi, M. Structural changes of the intrinsically disordered protein PQBP-1. 9th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, March 16, 2012, Sapporo.
- ③ Mizuguchi, M. Dynamic structural changes of the intrinsically disordered protein PQBP-1. 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences, Experiments and Simulations, January 11, 2012, Nara.
- ④ 水口峰之, 精神遅滞の原因タンパク質 PQBP-1 の構造と機能. 第21回 WS フォーラム タンパク質・ペプチド研究の現状と展望, 2011年11月19日, 福岡.
- ⑤ 水口峰之, 天然変性蛋白質 PQBP-1 の動的な構造変化. 物理学会2011年秋季大会, 2011年9月22日, 富山.
- ⑥ Mizuguchi, M., Takahashi, M., Okazawa, H. and Kawano, K. Fluctuation and function of polyglutamine tract binding protein-1. The 3rd International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, December 21, 2009, Nagoya.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phypha2/index-j.html>

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

なし

(3) 連携研究者

なし