

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06047

研究課題名（和文）オルガネラ間コンタクトを担う低親和性タンパク質複合体の溶液NMR解析

研究課題名（英文）Solution NMR study of low-affinity protein complexes involved in interorganelle contacts

研究代表者

古板 恭子（Furuita, Kyoko）

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：30727665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体膜蛋白質VAPはFFAT-likeモチーフと呼ばれる多様なアミノ酸配列を結合することが知られている。この相互作用は小胞体と他のオルガネラとの膜コンタクトサイトの形成や機能に関わっている。本研究では溶液NMRによりVAPと9種類のFFAT-likeモチーフとの相互作用を解析した。その結果、FFAT-likeモチーフは解離定数が数mMでVAPのFFATモチーフ結合部位と結合すること、結合にはFFAT-likeモチーフがVAPの疎水性ポケットに結合するフェニルアラニンおよびアラニン残基を持つことが重要であることが分かった。また小さい化学シフト摂動を解析するためのソフトウェア開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VAPとFFAT-likeモチーフとの相互作用は、膜コンタクトサイトにおいてオートファジーや神経伝達などの重要な細胞機能に寄与し、筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病との関連が指摘されている。またウイルスRNAの複製にも関わっている。本研究によりこのような重要な相互作用について結合様式や親和性などの結合の詳細が明らかになった。この情報はVAPとFFAT-likeモチーフの相互作用が関わる細胞機能や疾患の解析に利用しうる。また開発した化学シフト摂動実験の解析ソフトウェアはさまざまな低親和性の相互作用解析に利用できる。

研究成果の概要（英文）：The ER membrane protein VAP is known to bind to a variety of amino acid sequences called FFAT-like motifs. This interaction is involved in the formation and function of membrane contact sites between the ER and other organelles. In this study, we analyzed the interactions between VAP and nine different FFAT-like motifs using solution NMR. The results showed that the FFAT-like motifs bind to the FFAT motif-binding site of VAP with dissociation constants in the millimolar range. It was found that the phenylalanine and alanine residues, which bind to the hydrophobic pocket of VAP, are important for the binding of FFAT-like motifs. Additionally, we developed software to analyze small chemical shift perturbations.

研究分野：構造生物学

キーワード：溶液NMR 膜コンタクトサイト VAP FFAT-likeモチーフ 化学シフト摂動実験

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞において、各オルガネラおよび細胞膜は互いに近接した「膜コンタクトサイト(MCS)」と呼ばれる領域を形成している。近年、MCSはオルガネラ間の脂質やイオンの輸送、オルガネラ再編成、酵素反応などの場であり、様々な細胞機能に関わることが次々と報告されている(文献1)。

小胞体膜貫通蛋白質 Vesicle-associated membrane protein-Associated Protein (VAP)は、他のオルガネラあるいは細胞膜の蛋白質との相互作用により、MCSの形成や機能に中心的な役割を果たしている。VAPの細胞質側にある Major Sperm Protein (MSP)ドメイン (VAP<sup>MSP</sup>)はFFATモチーフ (two phenylalanines (FF) in an Acidic Tract) と呼ばれるペプチドモチーフ (コンセンサス配列「EFFDAXE」)を結合することが知られている。VAPとFFATモチーフとの相互作用は、研究代表者がこれまでに決定したVAP<sup>MSP</sup>とOxySterol Binding ProteinのFFATモチーフからなる複合体の溶液NMRによる立体構造解析などから詳細が明らかになっている(文献2)。しかし近年、VAP<sup>MSP</sup>はFFATモチーフのコンセンサス配列の複数の残基が置換された、極めて多様な配列を結合することが明らかになってきた。これらの配列はFFAT-likeモチーフと呼ばれる(図1)。VAP<sup>MSP</sup>とFFAT-likeモチーフとの相互作用は、MCSにおいてオートファジー、エンドソームからの逆行輸送、神経伝達などの重要な細胞機能に寄与し(図1)、筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病との関連が指摘されている(文献3-6)。研究代表者の予備的な実験から、FFAT-likeモチーフとVAP<sup>MSP</sup>との結合は通常のFFATモチーフより弱いことが判明している。

細胞内蛋白質のほか、FFAT-likeモチーフは1本鎖RNAウイルスの蛋白質にも見出されており、VAPは小胞体からウイルスRNA複製サイトへの脂質の供給に関与することが示されている。研究代表者はデータベース検索によりSARS-CoV-2のRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp<sup>SARS2</sup>)にもFFAT-likeモチーフが含まれていることを発見した。したがって、VAPはSARS-CoV-2のRNA複製にも関与している可能性がある。

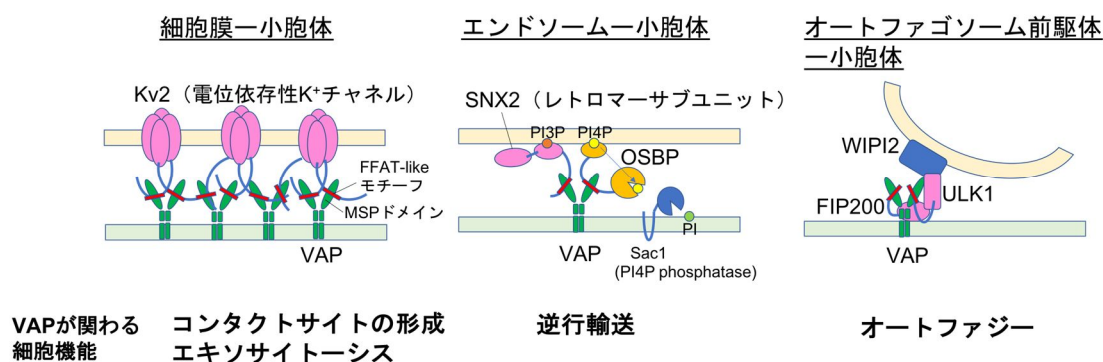


図1. MCSにおけるVAPとFFAT-likeモチーフの相互作用の例

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、低親和性の相互作用の解析に優れた溶液NMR法により、VAP<sup>MSP</sup>とFFAT-likeモチーフとの相互作用様式を解析することでVAP<sup>MSP</sup>の基質認識機構を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) NMR測定

すべてのVAP<sup>MSP</sup>のNMR測定はBruker社の600 MHz AVANCE III HD NMR装置を用い、303 Kで行った。データ処理にはNMRPipeソフトウェアを用い、解析にはNMRFAM-Sparkyを用いた。

#### (2) VAP<sup>MSP</sup>とFFAT-likeモチーフとの化学シフト摂動(CSP)実験

<sup>15</sup>N標識VAP<sup>MSP</sup> (0.1 mM)にモル比1:1で非標識FFAT-likeモチーフを含むペプチドを加えたときの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルの変化を調べた。実験に用いたペプチド配列を図2に示す。それぞれオートファジー誘導に関わるFIP200(文献3)、カリウムチャンネルKv2.1およびKv2.2(文

献 4) レトロマーサブユニット SNX2 (2 種類) (文献 5) オートファジーの制御に関わるミトコンドリア蛋白質 PTPIP51 (2 種類) (文献 6) あるいは RdRp<sup>SARS2</sup> の FFAT-like モチーフを含んでいる。結果の解析において化学シフト変化は次式で算出した。

$$\Delta\delta_{\text{NH}} = \sqrt{(\Delta\delta_{\text{N}}/5)^2 + (\Delta\delta_{\text{H}})^2}$$

(3) VAP<sup>MSP</sup> と FFAT-like モチーフの NMR 滴定実験  
<sup>15</sup>N 標識 VAP<sup>MSP</sup> (0.1 mM) に 1 : 0 から 1 : 10 のさまざまなモル比で SNX2-2、Kv 2.1、PTPIP51-1、あるいは RdRp<sup>SARS2</sup> の FFAT-like モチーフを含む非標識ペプチドを加えたときの化学シフト変化を調べ、次式に従い VAP<sup>MSP</sup> とペプチドとの  $K_d$  を決定した。

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{max}} \frac{K_d + [L]_0 + [P]_0 - \sqrt{(K_d + [L]_0 + [P]_0)^2 - 4[L]_0[P]_0}}{2[P]_0}$$

(4) CSP 実験の解析ソフトウェアの開発

CSP とその誤差を決定するプログラムは Python を用いて実装した。このプログラムは次の 5 つのステップからなる。(1) 比較する 2 つの <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルデータと、それぞれに対応する帰属情報を含むピークリストを読み込む。(2) 各残基について、ピークリストを使用して 2 つのスペクトルデータからピークの全体を含む領域を抽出する。(3) 各ピークの <sup>1</sup>H および <sup>15</sup>N 方向の射影をとる。(4) スペクトルのノイズレベルを考慮したランダムなガウシアンノイズを射影に追加する。(5) <sup>1</sup>H および <sup>15</sup>N のピーク位置をローレンツあるいはガウス関数でフィッティングして決定する。(6) CSP を式 (1) に従い算出する。(7) 手順(2)~(6)を 1000 回繰り返し、CSP の平均と標準偏差を決定し、それぞれ CSP およびその誤差とみなす。(8) (2)~(7)のステップを、ピークリストにあるすべての残基について繰り返す。

## 4. 研究成果

(1) VAP<sup>MSP</sup> と FFAT-like モチーフとの CSP 実験 (文献 7)

まず、これまでに文献で VAP<sup>MSP</sup> との結合が報告されているヒト蛋白質の FFAT-like モチーフを含むペプチドを添加した際の VAP<sup>MSP</sup> の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの CSP とピーク強度の変化を調べた (図 3)。蛋白質の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの各ピークは、各残基のアミド基に対応しており、このようなスペクトル変化を調べることで、結合部位や親和性を推定することが可能である。その結果、Kv2.1、Kv2.2、SNX2-2、および PTPIP51-1 は VAP<sup>MSP</sup> に比較的強く結合し、SNX2-1 と FIP200 は VAP<sup>MSP</sup> に弱く結合し、ULK1 または PTPIP51-2 は今回の実験条件下では VAP<sup>MSP</sup> に結合しないことが示された。VAP<sup>MSP</sup> と結合するものに関しては、FFAT モチーフ結合部位周辺において信号の変化が見られたことから、FFAT モチーフと同じ領域に結合することが示唆された。

次に、RdRp<sup>SARS2</sup> の FFAT-like モチーフと VAP<sup>MSP</sup> との結合を同じ実験により検討した。その結果、RdRp<sup>SARS2</sup> の FFAT-like モチーフは VAP<sup>MSP</sup> の FFAT モチーフ結合部位に比較的強く結合することが示された。

(2) VAP<sup>MSP</sup> と FFAT-like モチーフとの NMR 滴定実験 (文献 7)

VAP<sup>MSP</sup> と比較的強く結合した Kv2.1、SNX2-2、PTPIP51-1、および RdRp<sup>SARS2</sup> の FFAT-like モチーフを含むペプチドについて NMR 滴定実験を行い、VAP<sup>MSP</sup> との  $K_d$  を決定した。その結果、これらのペプチドはいずれも数 mM の  $K_d$  で VAP<sup>MSP</sup> と結合することが示された。この値は通常の FFAT モチーフを含む同じ残基数のペプチドよりも 1 桁大きい値であった。

FFAT consensus	E	F	F	D	A		E						
Kv2.1	D	S	F	I	S	C	A	T	-	D	F	P	
Kv2.2	D	S	F	T	S	T	A	T	-	D	F	T	
SNX2-2	D	L	F	A	E	-	A	T	-	E	E	V	
PTPIP51-1	V	-	Y	F	T	-	A	S	-	S	G	A	T
SNX2-1	D	L	F	T	S	-	A	V	-	S	T	L	
FIP200	D	-	F	M	S	-	A	V	N	E	F	V	
ULK1	E	-	Y	C	N	-	G	G	-	D	L	A	D
PTPIP51-2	T	-	F	T	D	-	A	E	S	E	G	G	
RdRp	E	-	F	Y	E	-	A	M	-	Y	T	P	H

図 2. FFAT モチーフのコンセンサス配列および本研究で用いた FFAT-like モチーフのアミノ酸配列

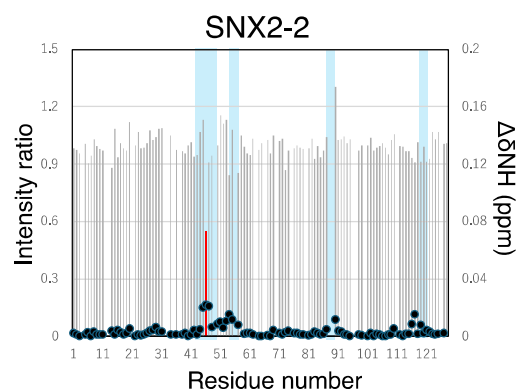


図 3. VAP<sup>MSP</sup> とペプチドとの CSP 実験結果の例 (SNX2-2 ペプチド)。CSP を点で、ペプチド有/無のピーク強度比を棒グラフで示している。背景の水色は FFAT モチーフの結合部位を示している。

滴定実験における VAP<sup>MSP</sup> のスペクトル変化の詳細な解析により、FFAT-like モチーフと VAP<sup>MSP</sup> との結合には FFAT-like モチーフが VAP<sup>MSP</sup> の疎水性ポケットに結合するフェニルアラニンおよびアラニン残基を持つことが重要であることが分かった。またフェニルアラニンとアラニンの間の残基数は2残基でも3残基でも良いこと示唆された。しかし FFAT-like モチーフの配列と親和性との関係は完全には明らかではなく、さらなる研究が必要である。

### (3) 化学シフト摂動実験の解析ソフトウェアの開発 (文献 8)

溶液 NMR による蛋白質の相互作用解析では CSP 実験がよく用いられる。しかし、CSP の有意性を決定する明確な指標は知られておらず、本研究のように相互作用が弱く CSP が小さい場合は結果の解釈が難しかった。そこで弱い相互作用を精度良く解析するために、CSP の誤差を決定する解析ソフトウェアの開発を行った。

作成したソフトウェアで VAP<sup>MSP</sup> と SNX2-2 の FFAT-like モチーフを含むペプチドとの CSP 実験結果を再解析したところ、このペプチドの中ほどから C 末端領域は FFAT モチーフの結合部位に結合するが、N 末端領域は FFAT モチーフとは異なる領域と相互作用することが示唆された。本解析ソフトウェアを用いることで従来の解析では得られなかった新たな知見が得られた。

(文献 1) L. Scorrano, M.A. De Matteis, S. Emr, F. Giordano, G. Hajnóczky, B. Kornmann, L.L. Lackner, T.P. Levine, L. Pellegrini, K. Reinisch, R. Rizzuto, T. Simmen, H. Stenmark, C. Ungermann, M. Schuldiner, Coming together to define membrane contact sites, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1-11.

(文献 2) K. Furuita, J. Jee, H. Fukada, M. Mishima, C. Kojima, Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 12961-70.

(文献 3) Y.G. Zhao, N. Liu, G. Miao, Y. Chen, H. Zhao, H. Zhang, The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis., *Curr. Biol.* 28 (2018) 1234-1245

(文献 4) B. Johnson, A.N. Leek, L. Solé, E.E. Maverick, T.P. Levine, M.M. Tamkun, Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115 (2018) 201805757.

(文献 5) R. Dong, Y. Saheki, S. Swarup, L. Lucast, J.W. Harper, P. De Camilli, Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P, *Cell.* 166 (2016) 408-423.

(文献 6) P. Gomez-Suaga, S. Paillusson, R. Stoica, W. Noble, D.P. Hanger, C.C.J. Miller, The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy, *Curr. Biol.* 27 (2017) 371-385.

(文献 7) K. Furuita, M. Hiraoka, K. Hanada, T. Fujiwara, C. Kojima, Sequence requirements of the FFAT-like motif for specific binding to VAP-A are revealed by NMR., *FEBS Lett.* 595 (2021) 2248-2256.

(文献 8) K. Furuita, C. Kojima, Improved analysis of NMR chemical shift perturbations through an error estimation method, *Biophys. Chem.* 310 (2024) 107255.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furuita Kyoko, Hiraoka Marina, Hanada Kentaro, Fujiwara Toshimichi, Kojima Chojiro	4. 巻 595
2. 論文標題 Sequence requirements of the FFAT like motif for specific binding to VAP A are revealed by NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2248 ~ 2256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuita Kyoko, Kojima Chojiro	4. 巻 310
2. 論文標題 Improved analysis of NMR chemical shift perturbations through an error estimation method	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 107255 ~ 107255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2024.107255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古板 恭子、平岡 万里菜、花田 賢太郎、藤原 敏道、児嶋 長次郎
2. 発表標題 溶液NMRによる膜コンタクトサイトの形成と機能に関するVAP-A:FFAT-likeモチーフ相互作用の研究
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Togawa, W., Furuita, K., Kobayashi, N., Fujiwara, T., Kojima, C
2. 発表標題 NMR structural analysis of human VAMP-associated protein B
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference and 9th Asia-Pacific NMR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸川 航、古板 恭子、小林 直宏、藤原 敏道、児嶋 長次郎
2. 発表標題 小胞体膜貫通蛋白質 VAP-B 及び VAP-B-FFAT motif 複合体の NMR 構造解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 篤、古板 恭子、戸川 航1、小林 直宏、宮ノ入 洋平、藤原 敏道、児嶋長次郎
2. 発表標題 小胞体局在タンパク質 VAP-A の NMR 構造解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古板 恭子、児嶋 長次郎
2. 発表標題 微小なスペクトル変化の評価法の開発
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------