

## 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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22570117

研究課題名（和文） マウス由来 GDE ファミリータンパク質の立体構造と作用機構の解明

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of GDE family proteins

研究代表者

青山 浩（AOYAMA HIROSHI）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：60291910

研究成果の概要（和文）：

マウス由来の GDE ファミリータンパク質の反応機構の解明のために、これらファミリータンパク質の機能構造解析研究を行った。活性に必須なマグネシウムイオン結合型を含む新しい条件で結晶が得られた。これらの結晶は最高で 3.0 Å 分解能の X 線回折能を示した。これらのデータは現在解析中である。

研究成果の概要（英文）：

For elucidation of the reaction mechanism of glycerophosphodiesterphosphodiesterase family protein (GDE1~7), studies on the structures and functions of GDE were carried out. Crystals of mouse membrane protein GDE1 were obtained in several new crystallization conditions including magnesium ion. These crystals diffracted up to 3.0 Å resolution, and we are analyzing these data to determine the structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膜タンパク質・X線結晶構造解析・構造生物学・脂質代謝

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜リン脂質の構成成分として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミンなどが知られている。それらのリン脂質がホスホリパーゼによって脱アシル化反応を受けて脂肪酸が切り離されると、グリセロホスホコリン（GPC）、グリセロホスホエタノールアミン（GPE）、グリセロホスホイノシトール

（GPI）、グリセロホスホセリン（GPS）などのグリセロホスホジエステルが生ずる。グリセロホスホジエステルをグリセロール 3-リン酸（G3P）とコリンなどのアルコールに加水分解するのがグリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼ（GDE）である（図 1）。

微生物の GDE は、GPC、GPE、GPI、GPS などのグリセロホスホジエステルを非特異的に加水分解して、リンや炭素源などに再利用されていると考えられている。哺乳動物に

おいては、その酵素活性が組織中に存在することは知られていたが、その実体は不明であった。ところが、哺乳動物でも GDE の存在が確認され、マウスでは少なくとも GDE1~GDE7 までの 7 種類が存在することが明らかとなった。このうち GDE5 以外は膜タンパク質と考えられている。一方で、哺乳動物の膜タンパク質結晶学は萌芽の段階であり、そのニーズは高まっている状況にあった。

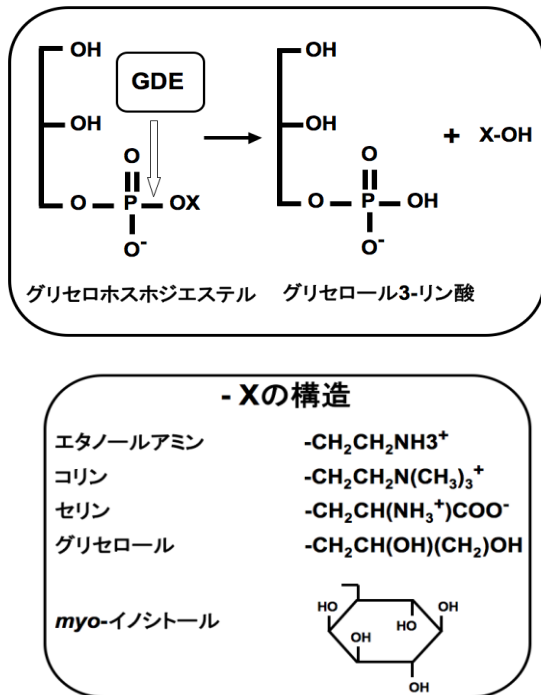


図1 GDE の基質と酵素反応部位

## 2. 研究の目的

GDE1~7 を順次、大量発現・精製しそれぞれの基質特異性や活性に關与する金属イオンを同定する。次に、結晶化条件の検索、X線結晶構造を決定して、その反応機構を解明することを目的とする。

## 2. 研究の方法

マウス GDE1~7 の C 末端に V5-epitope とヒスチジンタグを付加した mGDE1~7 (from FANTOM clone) をバキュロウイルスを用いて昆虫細胞 (Sf9) で大量発現させた。菌体を超音波破碎し遠心後の沈殿を膜画分として回収した。界面活性剤である dodecyl-D-maltoside を添加して GDE を可溶化し、ニッケルカラムとゲル濾過カラムを用いて精製を行った。精製段階における純度検定を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により行った (図2)。7 種類の GDE のうち GDE1

は、3L culture で約 10mg の精製標品を得ることができた。

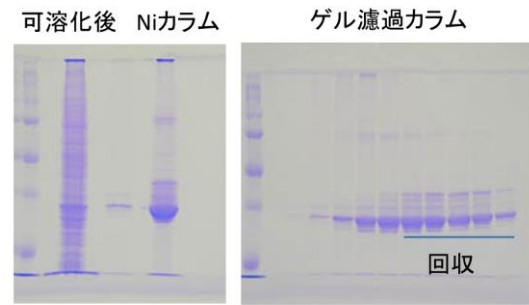


図2 精製GDE1のSDS-電気泳動

## 3. 研究成果

### 発現・精製

7 種類のマウス GDE ファミリータンパク質のうち、GDE1 (2 回膜貫通タンパク質)、GDE4 (1 回膜貫通タンパク質)、GDE5 (水溶性タンパク質) および GDE7 (1 回膜貫通タンパク質) の発現・精製に成功した (表1)。これらの中で、2 回膜貫通タンパク質 GDE1 の機能構造解析を先行して行った。

表1 マウス GDE ファミリーの発現・精製状況

	分子量	膜貫通ヘリックスの数	発現・精製
GDE1	35,000	2	○
GDE2	60,000	7	×
GDE3	60,000	7	×
GDE4	35,000	1	○
GDE5	65,000	0	○
GDE6	60,000	7	×
GDE7	35,000	1	○

### 酵素活性の測定

GDE 反応で生じたグリセロール 3-リン酸にグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼと NAP+ を加えて得られた NADH の 340nm の吸光度を追跡することで、GDE 活性を測定した。GDE1 はこれまでに報告されていたグリセロホスホイノシトール (GPI) よりグリセロホスホセリン (GPS) に対して 10 倍以上の高い酵素活性を示した (図3)。また同じ酸性リン脂質由来のグリセロホスホグリセロール (GPG) も GPI と同等の活性を示したが、極性基に正電荷をもつグリセロホスホコリン (GPC) に対する活性は全く求められなかった (図4)。

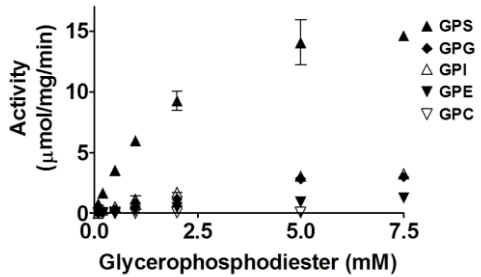


図3 GDE1の基質特異性  
(基質:GPS,GPG,GPI,GPE,GPC)

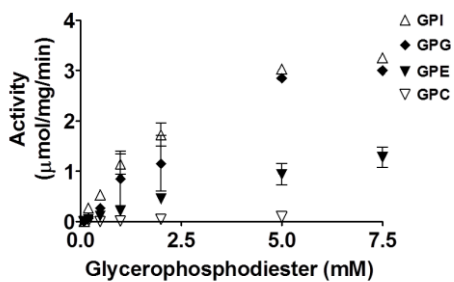


図4 GDE1の基質特異性  
(基質:GPI,GPG, GPE,GPC)

次に、GDE1 酵素活性における2価金属イオンの影響を調べた(図5)。その結果、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ が活性上昇に寄与し、 $Mn^{2+}$ が最も高活性であることがわかった。また $Ca^{2+}$ は活性に影響を及ぼさなかった。この活性における金属イオンの効果は、バクテリアのグリセロホスホジエステルのホスホジエステラーゼであるUgpQと同様の金属イオン要求性であった。

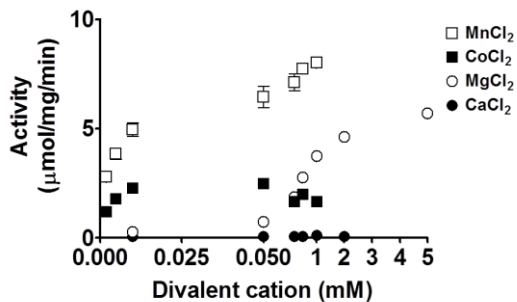


図5 GDE1酵素活性の金属イオン要求性

## GDE1の組織内分布の解析

GDE1 に対するポリクローナル抗体を使用してウエスタンブロットによる組織分布・免疫組織化学を行った。その結果、GDE1は精囊腺に多く発現し、ついで前立腺・脳・肺などにも発現が認められた(図6)。

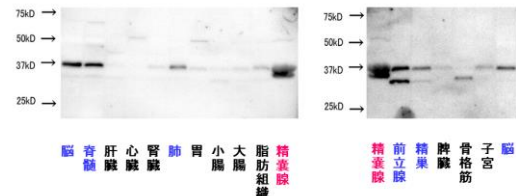


図6 GDE1のウエスタンブロットによる組織分布解析

## 結晶化とX線回折データ収集

ニッケルカラムとゲル濾過で精製した標品を用いて結晶化条件の検索を行った。市販の結晶化スクリーニングキットを用い、蒸気拡散法(ハンギングドロップ法・シッティングドロップ法)とマイクロバッチ法で初期条件の検索を行った。その結果、沈殿剤にJeffamine M-600を用いることで、きわめて再現性よく結晶が得られることが明らかとなった(図7)。

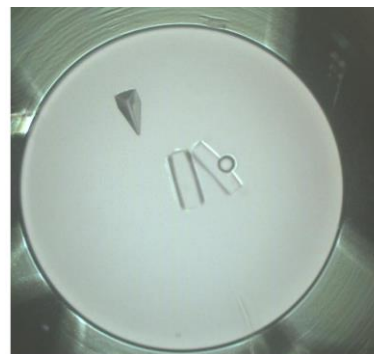


図7 2回膜貫通タンパク質GDE1の結晶

得られた結晶に各種クライオプロテクタントを浸透させて、液体窒素凍結後、大型放射光施設 (SPring-8) の大阪大学蛋白質研究所ビームライン (BL44XU) にてデータ収集を行った結果、3Å分解能の回折点を確認し(図2)、4Å分解能までのデータ収集に成功した(表2)。

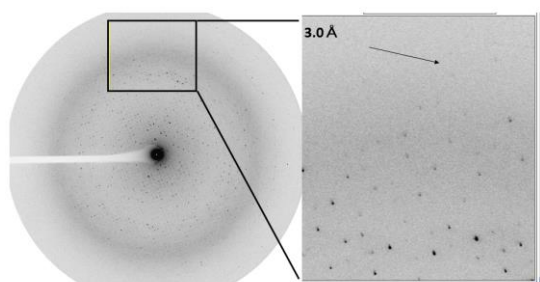


図8 GDE1結晶のX線回折像

表2 GDE1結晶のX線回折データ

Space group	Hexagonal
Unit cell dimensions	a = b = 94.17 Å c = 94.47 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
Resolution(Å)	200 – 4.00 (4.14 – 4.00)
Number of total reflections	28,468 (3,026)
Number of unique reflections	7,755 (788)
Redundancy	3.7 (3.8)
R <sub>merge</sub>	0.080 (0.152)
Mean I / $\sigma$ I	12.3 (10.9)

得られたX線回折データを使用して、分子置換法による位相決定を試みたが、現在のところ解はみつかっていない。膜貫通領域を有する新規構造であるためと考えられる。そこで、重原子同型置換法による位相決定を進行中である。また、最低でもアミノ酸側鎖構造が決定できる構造を得るために、高分解能結晶の作製にも取り組んでいる。

#### 4. 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2件)

1. 大嶋紀安、岡崎優利、吉澤郁美、亀井康富、Stefania Mariggio、岡本佳子、立井一明、岸本幸治、小川佳宏、加藤範久、Daniela Corda、矢中規之、和泉孝志 哺乳動物のGDE群とマウスGDE5の非酵素的機構による骨格筋分化制御 **脂質生化学研究** 53, 208-209 2011 (査読無)
2. Okazaki Yuri, Ohshima Noriyasu, Yoshizawa Ikumi, Kamei Yasutomi, Masiggio Stefania, Okamoto Keiko, Maeda Masahiro, Nogusa Yoshihito, Fujioka Yuichiro, Izumi Takashi, Ogawa Yoshihiro, Shiro Yoshitsugu, Wada Masanobu, Kato Norihisa, Corda Daniela, Yanaka Noriyuki A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. **J. Biol. Chem.** 285, 27652-27663, 2010 (査読有)

[学会発表] (計1件)

1. 大嶋紀安、立井一明、金子真弓、城宜嗣、和泉孝志 マウス由来グリセロホスホジエステルのホスホジエステラーゼ(GDE1)の基質特異性と組織分布の解析 第83回 日本生化学会大会(神戸), 2010

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

青山 浩 (AOYAMA HIROSHI)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：60291910

##### (2) 連携研究者

大嶋 紀安 (OHSHIMA NORIYASU)  
群馬大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30360514