

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 5月 20日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570126

研究課題名（和文）固体 NMR による新規室温磁場配向膜を用いた膜表在性タンパク質脂質結合機能の解明

研究課題名（英文）Investigation of membrane binding mechanism of peripheral membrane protein based on solid state NMR using magnetically aligned membrane bilayers at room temperature

研究代表者

西村 勝之（NISHIMURA KATSUYUKI）

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・准教授

研究者番号：00334631

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト由来の PLC- $\delta 1$ の脂質結合部位である PH ドメイン（hPH）の脂質結合機構を解明するため、新規開発した Native-PAGE を用いた評価法により、hPH の IP_3 への結合活性、および熱安定性を解析した。次に溶液 NMR を用いた解析で、水相での hPH の IP_3 結合に伴う $\alpha 2$ -ヘリックス部位が関与する連鎖的な局所的構造変化を検出し、分子内相互作用ネットワークにより、hPH のリガンド結合機能が調節されていることが判明した。さらに、固体 NMR を用いた解析から、hPH が PIP_2 を含有する脂質二重膜の表面に結合後、不均一構造を誘起することが判明し、不可逆的な脂質膜内部への挿入が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Phospholipase C (PLC) binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) in the cell membrane through the pleckstrin homology (PH) domain, and hydrolyzes PIP_2 to produce two second messengers, diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), by the catalytic domain.

In this study, lipid binding mechanism of human PLC- $\delta 1$ PH domain (hPH) was explored. First, the contributions of the $\alpha 2$ -helix to the IP_3 binding activity and thermal stability of the hPH domain were investigated by developed approach based on Native-PAGE methods. Then, linked local structural changes of hPH induced by the IP_3 binding were detected by solution NMR. It was found that intra molecular interaction network in hPH controls its ligand binding. Furthermore, through the analyses of solid state NMR, it was also found that hPH induces inhomogeneous structure after binding to a surface of PIP_2 embedded lipid bilayers and implied that hPH is finally inserted to lipid bilayers irreversibly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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、固体 NMR、配向試料、バイセル、膜表在性、PLC- δ 1、PH ドメイン、開発

1. 研究開始当初の背景

脂質膜表面結合に結合してその機能を発現するタンパク質は、膜表在性タンパク質と呼ばれる。膜表在性タンパク質は、両親媒性の性質を持ち、生体中の水相を移動しながら、目的の細胞膜表面に到達すると、脂質二重膜中の特定の脂質分子と特異的、または非特異的に結合し、その機能を発現する。このため、このような膜表在性タンパク質の機能発現機構の分子論的な解明には、同タンパク質の水相中での単独、およびリガンド結合状態、さらに脂質二重膜結合状態での、詳細な分子レベルでの知見が必要である。

リガンド-タンパク質複合体の結晶が得られれば、X線結晶解析により、水相に近い状態での立体構造に関する詳細な情報が得られる。しかし、同タンパク質のように、その機能が発現する十分に水和された脂質二重膜試料の取り扱いが原理的にできない。一方、同タンパク質の水溶液中での構造解析や、水溶性リガンド結合状態の解析には、溶液 NMR が有効である。さらに、脂質結合時の構造解析には、異方的試料の解析が可能な固体 NMR が有効である。

2. 研究の目的

本研究では、NMR を主な研究手段として、膜表在性タンパク質の構造、および機能解析に有効な手法などの開発も行い、ヒト由来 PLC- δ 1 の脂質結合ドメイン hPH の脂質結合機能の解明を目的とした。特に、脂質結合状態では、以前の研究で独自開発した新規室温自発磁場配向膜を用いて、配向状態での同タンパク質の解析を目指した。

3. 研究の方法

(1) native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE) を用いた hPH のリガンド結合活性、および熱安定性変化の解析

まず、hPH、およびその変異体を、hPH-GST 複合体として発現する大腸菌発現系を新規に構築し、同タンパク質試料を調製した。

Lys57 残基を Ala 残基に置換した IP₃ への結合活性が著しく低下する変異体 K57A-hPH と WT-hPH で IP₃ 添加の有無による Native-PAGE 結果を比較し、Native-PAGE により結合活性評価ができることを確認した。

さらに、市販 BSA を用いて、複数の特定温度下に一定時間放置した試料で Native-PAGE 解析を行い、同タンパク質の変性によるシフト量変化を観測し、タンパク質の温度安定性評価が可能であることを検証した。複数の

hPH の変異体を調製し、これらの方法を用いて IP₃ への結合活性の差、および各変異体間での熱安定性の差に関して検討した。

(2) hPH の水溶性リガンド IP₃ 結合に伴う構造変化に関する溶液 NMR による解析

Wt、および各変異体 hPH に関して、Lys 主鎖アミド基を特異的に ¹⁵N 安定同位体標識した [α -¹⁵N]Lys-hPH 水溶液を調製した。600MHz NMR (¹H 共鳴周波数 600MHz) を用いて、¹⁵N-HSQC 測定を行った。Lys 残基を Ala 残基に置換した変異体を用いて全ての信号を帰属した。さらに IP₃ を添加した試料と無添加試料で信号変化を観測した。

(3) hPH の脂質二重膜結合状態での固体 NMR による解析

Ala 側鎖メチル基を特異的に ¹³C 安定同位体標識した [3 -¹³C]Ala-hPH 水溶液を調製した。POPC : PIP₂=95:5 の脂質分子組成からなるマルチラメラベシクルを調製し、上記のタンパク質水溶液の添加により、本ベシクル最表面に hPH が結合した試料を超遠心機を用いて遠心沈降させたペレット試料を調製して固体 NMR 測定に用いた。400MHz (¹H 共鳴周波数 400MHz) と 920MHz (¹H 共鳴周波数 920MHz) NMR で測定を行った。試料の回転周波数 5kHz、試料温度 20°C の条件下で、CP-MAS、シングルパルスによる ¹³C 磁化の直接励起、および試料回転同期型 INEPT の測定を行った。

(4) 静止試料用ナローボア ¹H-X 二重共鳴固体 NMR プロブの開発

多様な形状の静止試料に対応する独自設計のプロブヘッドを設計、製作した。本部品を、ナローボア ¹H-X 二重共鳴 MAS プロブに組み込み、静止条件試料用の高感度 ¹H-X 二重共鳴固体 NMR プロブの開発を行った。

4. 研究成果

(1) hPH の変異体 K86P、K86A、K87A、F87Y に関して、0 から 300 μ M の濃度範囲で IP₃ を添加した試料の Native-PAGE 解析を行った。各 IP₃ 濃度でのシフトピーク強度プロットを Fig 1 に示す。Lys86 残基、および Phe87 残基は、共に α 2 ヘリックス中に存在し、IP₃ 結合部位が存在する β 1- β 2 ループに空間的に近接している。K86A、および K86P は、 α 2 ヘリックス構造の寄与を、また、F87Y、および F87A は側鎖の芳香環構造の寄与を各々検証するための変異体である。Fig1 の結果比較から、 α 2 ヘリックス構造が IP₃ 結合活性維持に必要であり、Phe87 残基の側鎖の芳香環が

活性に寄与していることが判明した。IP₃ 結合状態の rat 由来の PLCδ-PH の X 線結晶構造から、この Phe87 残基側鎖から空間的に隣接したアミノ酸残基の主鎖、および側鎖を介した複数の相互作用によるネットワークが IP₃ のリン酸まで続いていることが示唆された。以上の解析から、これらの一連の主鎖-側鎖間の結合ネットワークが IP₃ 結合時の hPH の構造安定化に寄与していることが示唆された。

さらに、これら変異体を 0 から 80°C の温度範囲で熱処理した試料の Native-PAGE 解析を行い、IP₃ の結合能の変化について解析した。その結果、hPH に特徴的に存在し、基質は直接結合しない α2 ヘリックス部位が、hPH の基質結合状態の安定化、およびタンパク質の熱安定性の向上に寄与することが同様に判明した。

上述のように、本研究では、研究室で通常備えている安価な機器を用いて、タンパク質の重要な性質であるリガンド結合活性解析や熱安定性評価法の開発に成功した。

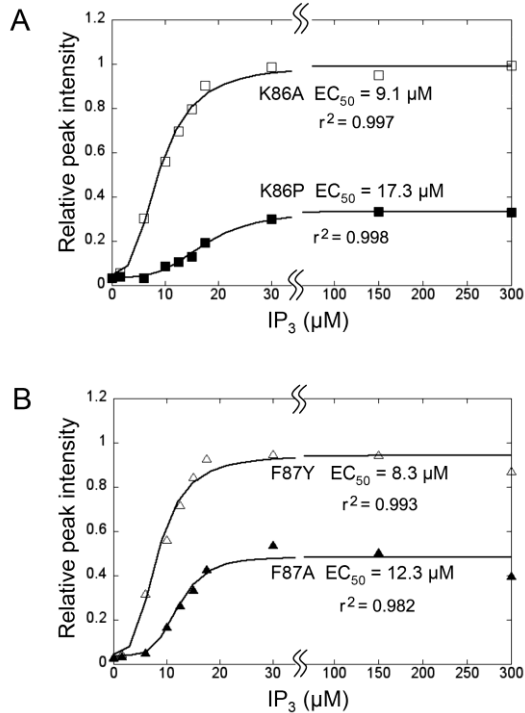


Fig. 1 IP₃ 添加濃度に対する各 hPH 変異体の Native-PAGE での最大信号強度プロット

(2) IP₃ 滴定による [α-¹⁵N]Lys-hPH の ¹H-¹⁵N-HSQC スペクトル変化を観測した。Fig2A に示すように、IP₃ 添加により、全ての Lys 残基の信号変化が観測された。しかし、IP₃ 滴定による Chemical Shift Perturbation (CSP) は、低い IP₃/hPH モル比で生じ、同モル比 0.7 でほぼ飽和した。このことから、この CSP は非特異的吸着ではなく、特異的結合サ

イトへの結合であることが判明した。また、Native-PAGE でも同様な結果が得られた。さらに、変異体を用いた解析から、リガンド結合部位に存在する Lys30、32、34 残基の側鎖を含む相互作用ネットワークが、IP₃ の結合により変調され、Lys57 および Phe87 残基が IP₃ 結合安定化に寄与する新しい相互作用ネットワークが生じることが判明した。

これらの一連の結果から、PLC δ 1-PH ドメインのリガンド結合機能が、リガンド結合サイトから空間的に離れたサイトの変調によって、分子内相互作用を介してアロステリックに調節されていることが判明した。また、本研究が、水相での PLC-δ タンパク質群の PH ドメインに関する、溶液 NMR を用いた初めての解析結果である。

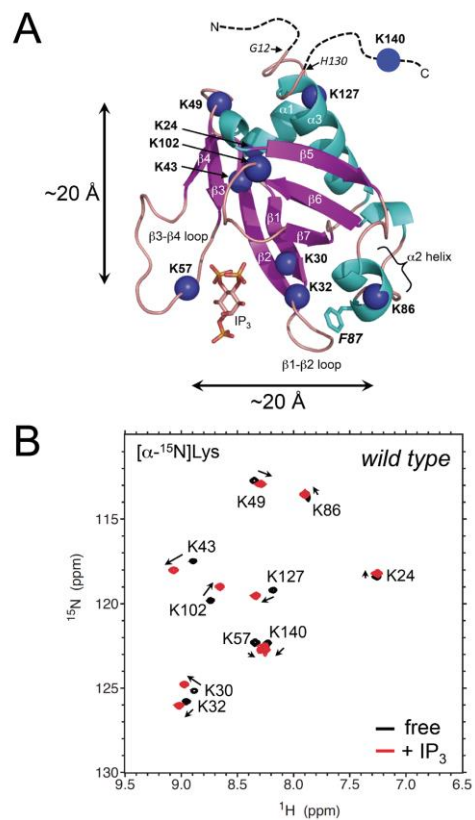


Fig. 2 A: hPH 中の安定同位体標識した Lys 残基の位置。B: IP₃ 添加の有無による hPH [α-¹⁵N]Lys-hPH ¹⁵N-HSQC スペクトル。(赤: 添加物、黒: 無添加)

(3) Ala 残基側鎖メチル基を特異的に ¹³C 安定同位体標識した [3-¹³C]Ala-hPH を上記の大腸菌発現系を用いて調製した。生体膜の PIP₂ 濃度を模倣したモル比 PIP₂:POPC=1:19 のマルチラメラベシクルを調製し、上記の [3-¹³C]Ala-hPH を同マルチラメラベシクル最表面に結合させた試料に関して、400MHzNMR と 920MHzNMR で、CP-MAS, シングルパルスによる ¹³C 磁化の直接励起、および試料回転同

期型 INEPT の測定を行った。しかし、どの場合にも信号強度は極めて低く、かつ広幅であった。同測定は試料調製に用いた緩衝液、試料調製法、脂質の購入先など、複数の試料調製に関わる因子を変更しても再現された。

このため、同タンパク質は脂質膜表面結合状態では、不均一構造を取っていることが示唆された。本結果は、他研究グループにより報告されている同タンパク質と脂質膜との相互作用解析で観測される不可逆的な脂質結合の知見とも一致した。以上の解析、および過去の研究による知見を総合して、hPH は PIP₂ を含有する脂質二重膜表面に結合後、同タンパク質が不均一構造を誘起し、不可逆的な脂質膜内部への挿入が示唆された。

上述の一連の解析により、脂質結合時に同タンパク質は不均一構造を持つことが示唆され、かつ当初の研究目的である結合機構の解明は達成されたため、配向試料による解析は見送った。

(4) JEOL 社製ナローボア 400MHz NMR 用 6mm 0. D. MAS プローブのプローブヘッドを撤去し、独自設計のプローブヘッドを設計、製作し、設置した。本プローブは、静止試料の条件に応じて、ソレノイドコイルの長さ、巻き数、内径などの形状の異なるコイルへの交換が容易な仕様とした。また、コイル形状に依存せず精密な温度調製が可能なようデザインにした。固定キャパシタなどの設定を変更し、4 mm 内径 12 巻のソレノイドコイルを設置した場合、¹H-¹³C の組み合わせで ¹H:120kHz、¹³C:100kHz のラジオ波の照射を可能にした。さらに、検出感度を約 2 倍に改善することに成功した。

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 7 件)

① T. Asakura, K. Yazawa, K. Horiguchi, F. Suzuki, Y. Nishiyama, K. Nishimura, H. Kaji, ” Difference in the structures of alanine tri- and tetra-peptides with antiparallel β -sheet assessed by X-ray diffraction, solid-state NMR and chemical shift calculations by GIPAW”、*Biopolymers*、査読有、2013、in press、DOI: 10.1002/bip.22241

② M. Tani, K. Nishimura “Intramolecular allosteric interaction in the

phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain”、*Biochim. Biophys. Acta*、査読有、Vol. 1834、2013、pp1034-1043 DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.034,

③ K. Yazawa, F. Suzuki, Y. Nishiyama, T. Ohata, A. Aoki, K. Nishimura, H. Kaji, and T. Asakura, “Determination of accurate ¹H positions of alanine tripeptide with anti-parallel and parallel β -sheet structures by high resolution ¹H solid state NMR and GIPAW chemical shift calculation”、*Chem. Comm.*、査読有、Vol. 48、2012、pp 11199-11201、DOI: 10.1039/c2cc36300c.

④ M. Tani, and K. Nishimura, “Analysis of the phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain using Native polyacrylamide gel electrophoresis”、*Anal. Biochem.*、査読有、Vol. 431、2012、pp106-114、DOI: 10.1016/j.ab.2012.09.012.

⑤ A. Tsutsumi, N. Javkhlantugs, A. Kira, M. Umeyama, I. Kawamura, K. Nishimura, K. Ueda, and A. Naito, ” Structure and orientation of bovine lactoferrampin in the mimetic bacterial membrane as revealed by Solid-State NMR and molecular dynamics simulation”、*Biophys. J.*、査読有、Vol. 103、2012、pp 1-9、DOI: 10.1016/j.bpj.2012.09.010,

⑥ T. Iijima, and K. Nishimura, “²H quadrupolar Carr-Purcell-Meiboom-Gill NMR for paramagnetic solids”、*Chem. Phys. Lett.*、査読有、Vol. 514、2011、pp 181-186

⑦ S. Toraya, N. Javkhlantugs, D. Mishima, K. Nishimura, K. Ueda, and A. Naito, “Dynamic Structure of Bombolitin II Bound to Lipid Bilayers as Revealed

by Solid-state NMR and Molecular-Dynamics Simulation”, *Biophys. J.*、査読有、Vol. 99、2010、pp 3282-3289

[学会発表] (計 11 件)

① 第51回NMR討論会, 2012年11月8-10日, M. Tanio, and K. Nishimura “NMR and Native-PAGE analyses of the phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain”

② 第51回NMR討論会, 2012年11月8-10日, 矢澤宏次、鈴木不律、西山裕介、西村勝之、梶弘典、朝倉哲郎, “生体分子の ^1H 精密位置決定～超高速MAS ^1H 固体NMRによる ^1H DQMAS測定とGIPAW化学シフト計算～”

③ 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月21-23日, M. Tanio, K. Nishimura, “The short α 2-helix of the phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain contributes to stable IP_3 binding”

④ 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月21-23日, N. Tokuda, M. Tanio, K. Nishimura, T. Kohno, D. Yokogawa, T. Ikegami, S. Tuzi, “脂質二重膜上における Def6 PH ドメインの高次構造の解析”

Conformational properties of the Def6 PH domain located at the lipid bilayer surface

⑤ 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, “ ^1H 固体NMRの新時代 ～ ^1H の位置からみるペプチドおよびタンパク質の分子間構造解析～” 矢澤宏次、杉本真理、西山裕介、西村勝之、鈴木不律、梶弘典、朝倉哲郎

⑥ 第61回高分子討論会, 2012年9月19-21日, 大畑卓也, 矢澤宏次, 青木昭宏, 西山裕介, 西村勝之, 朝倉哲郎 “高分解能 ^1H 固体NMR を用いた家蚕絹結晶部モデルペプチドの分子間構造解析”

⑦ 第12回日本蛋白質科学会年, 2012年6月20-22日, M. Tanio, and K. Nishimura “The short α 2-helix of the phospholipase C- δ 1

pleckstrin homology domain stabilizes the protein- IP_3 interaction”

⑧ 第50回NMR討論会, 2011年11月15-18日, K. Yazawa, K. Miyazawa, T. Ohata, Y. Nishiyama, K. Nishimura, T. Asakura “ ^1H spin diffusion solid state NMR analysis of the crystalline structures of alanine oligomers”

⑨ 第50回NMR討論会, 2011年11月15-18日, T. Kameda, H. Teramoto, D. Hashizume, H. Koshino, K. Nishimura, “Hydrogen-bonding network and rotational motion of Ser side-chain studied by solid-state NMR”

⑩ 第49回NMR討論会, 2010年11月15-17日, 上釜奈緒子、辻暁、西村勝之, “不飽和脂質を含有するバイセルに関する固体NMRを用いた研究”

⑪ 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20-22日, 上釜奈緒子、西村勝之”
Orientational Properties of New Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine as Studied by Solid State NMR Spectroscopy”

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.ac.jp/publications/letters67/301.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村勝之 (NISHIMURA KATSUYUKI)

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・准教授

研究者番号：00334631

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

谷生 道一 (TANIO MICHIKAZU)

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・特任助教

研究者番号：10416662