

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570190

研究課題名(和文) タンパク質分子内情報伝達の分子機構

研究課題名(英文) Intramolecular allosteric interactions in proteins

研究代表者

谷生 道一 (Tanio, Michikazu)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：10416662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼC-1(PLC-1)プレクストリン相同(PH)ドメインおよびM-フィコリンをモデルタンパク質として、タンパク質分子内情報伝達機構の解明を試みた。PLC-1 PHドメインでは、NMRおよびNative-PAGEによる解析の結果、主にLys30、Lys32、Tyr42、Lys43、Lys57およびPhe87などのアミノ酸側鎖が媒介する分子内相互作用ネットワークの存在が明らかとなった。またM-フィコリン基質結合ドメイン(FD1)では、そのタンパク質分子内情報伝達機構の解明のための準備段階として、単量体FD1の溶液NMRによる信号帰属に成功した。

研究成果の概要(英文)：Spatially separated sites in a protein molecule communicate by intramolecular allosteric interactions, which generally regulate protein activities. To investigate the detailed molecular mechanisms of intramolecular allosteric interactions, the phospholipase C-1 (PLC-1) pleckstrin homology (PH) domain and M-ficolin are employed as model proteins. By the NMR and Native-PAGE analyses of the PLC-1 PH domain, it was found that some side chains in the protein mediate the allosteric interactions, which regulate the ligand-binding activity. As the first step to investigate the intramolecular allosteric interactions in M-ficolin, we assigned the backbone NMR signals of the monomeric M-ficolin recognition domain, suggesting that the secondary structure predicted by the assignments is similar to that of the trimeric protein in the crystal.

研究分野：生物物理

キーワード：分子内情報伝達 タンパク質 相互作用 NMR 分子内アロステリー PHドメイン フィコリン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、基質等の他の生体分子と相互作用することで、その機能を発現する。このような生体分子間相互作用については、これまで生化学的・物理化学的研究が国内外で数多く行われており、特に X 線回折法や NMR 分光法によるタンパク質-基質複合体立体構造研究では、基質の結合様式や基質結合に伴うタンパク質の立体構造と運動性の変化など、原子レベルにおける極めて有益な情報が得られている。一方、このような複合体の立体構造情報から、タンパク質の機能について全て説明できている訳ではなく、構造-機能相関が十分に理解されているとは言えない。これは、基質結合に伴うタンパク質の立体構造・運動性変化が、どのような原理で誘起されるのかが明確になっていないことが原因である。さらに、基質結合に伴う構造変化が確認されていないタンパク質も存在しており、基質選択性についての説明は出来るものの、基質結合の後に起こる機能発現機構についての理解をより困難にしている。

我々はこれまで、7 本膜貫通型タンパク質、細胞質内タンパク質、細胞外分泌性タンパク質および膜表面タンパク質の構造-機能相関について研究を行い、基質結合や部位特異的変異導入に伴うタンパク質の高次構造と運動性の変化について解析を行って来た。このうち、光駆動プロトンポンプ膜タンパク質バクテリオロドプシンの研究では、タンパク質分子中心部あるいは細胞質側に位置するアミノ酸残基の変異により、約 15-30Å 離れた細胞外膜表面ループの構造・運動性が変化することを発見した (①、②)。また、膜表面タンパク質ホスホリパーゼ C (PLC) - $\delta 1$ プレクストリン相同 (PH) ドメインの NMR 解析では、基質であるイノシトール三リン酸 (IP_3) の結合に伴い、 IP_3 結合部位から 15~18Å 離れた部位における残基の NMR 信号に変化が観測された。これらの結果は、タンパク質分子内において、局所的な変化情報を別の部位へ伝達する分子内情報伝達機構が存在することを示している。バクテリオロドプシンの場合、この分子内情報伝達は、プロトンチャンネルに位置する特定のアミノ酸残基間で主に行われていることが明らかとなっているが、PLC- $\delta 1$ PH ドメインについては、その詳細は明らかではない。

一方、我々が世界で初めて三次元結晶構造解析に成功した分泌性タンパク質 M-フィコリン基質結合ドメインでは (③)、海外の研究グループにより、基質結合に伴う立体構造変化はほとんど起こらないことが明らかにされ、我々の NMR による解析でも同様の結論を得ている。しかし、M-フィコリンは基質結合の後に、プロテアーゼ MASP を活性化することが実証されており、M-フィコリンが基質結合したという情報を、MASP に伝達する何らかの機構が存在しなければならないが、その詳細は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質分子内情報伝達機構についての一般法則の発見を目指し、分子内情報伝達の様式が異なると予想される PLC- $\delta 1$ PH ドメインと M-フィコリンを主なモデルタンパク質として採用し、それらの分子内情報伝達機構、すなわち分子内アロステリック相互作用機構の解明を目的とした。本研究期間の到達目標として、PLC- $\delta 1$ PH ドメインについては、(1) NMR 信号の帰属、(2) 分子内情報伝達現象の再確認、(3) 変異体解析による情報伝達媒介アミノ酸残基の同定を、また M-フィコリンについては、(4) 分子内情報伝達様式の探索を設定した。

3. 研究の方法

(1). 試料調製

ヒト PLC- $\delta 1$ PH ドメイン (17.1 kDa) およびその変異体は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として、大腸菌発現系を用いて調製した。安定同位体標識試料は、M9 培地を用いて培養することで調製した。発現した目的タンパク質は、GST カラムによるアフィニティー精製を行い、プロテアーゼにより GST タグを切除後、さらにゲルろ過クロマトグラフィーカラムにより精製し、最終試料とした。

ヒト M-フィコリン基質結合ドメイン (FD1) の単量体変異体 (F127S/L128S, 26.8 kDa) およびそのヒスチジン置換変異体は、プレバチルス分泌発現システム (TaKaRa Bio) を用いて調製した。プレバチルス発現タンパク質の安定同位体標識試料は、既に我々が確立している C.H.L.培地 (クロレラ工業) を用いた方法にて調製した (④、⑤)。全ての FD1 およびその変異体は、C 末ヒスチジンタグ融合タンパク質として発現し、ヒスタグアフィニティーカラムおよびゲルろ過クロマトグラフィーカラムによる精製後、最終試料とした。

(2). Native-PAGE 解析

非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) 法は、目的の緩衝液で希釈した試料に、必要に応じて適切な量の基質と混合し、SDS 不含ポリアクリルアミドゲル (5-20% グラジエントゲル、Wako) にアプライし、中性条件 (pH 7.4) の泳動バッファーを用いて泳動を行った。CBB 染色後のゲルは、ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いてバンド強度の解析を行った。

(3). NMR 測定

PLC- $\delta 1$ PH ドメインおよびその変異体の NMR 測定は、JEOL JNM ECA600 分光器を用いて 20°C にて行った。FD1 およびその変異体の NMR 測定は、Bruker AVANCE II 700 分光器を用いて 27°C にて行った。

(4). ZAC 解析

FD1 およびその変異体のゾーン弱親和性クロマトグラフィー (ZAC) 解析は、FD1 の基質である N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 固定化アガロースを約 500 μL 封入したカラムを用いて、既に我々が確立した方法を用いて行った (⑥)。

4. 研究成果

(1). PLC- δ 1 PH ドメインの NMR 信号帰属

PLC- δ 1 PH ドメインの分子内情報伝達現象を観察するため、 $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys 標識試料の NMR 信号帰属を行った。PLC- δ 1 PH ドメインには、Lys が 10 残基存在し、タンパク質分子全体に分布していること、また IP_3 結合に Lys30、Lys32 および Lys57 が直接関与していることから、適切なプローブと考えられた。 $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys 標識野生株の ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトルを測定したところ、予想通り 10 個の信号が観測され、Lys 置換変異体の解析から、全ての ^1H - ^{15}N HSQC 信号の帰属に成功した (図 1)。

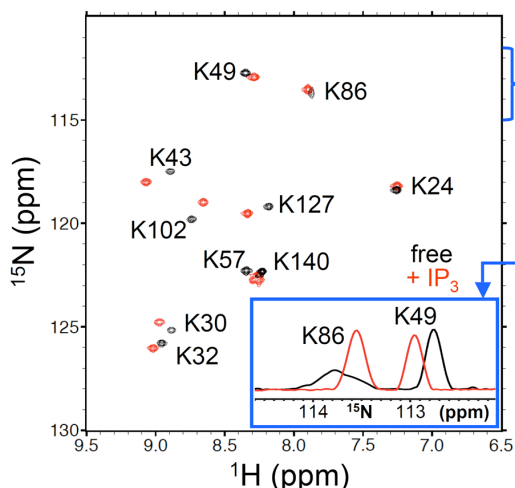


図 1 $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys 標識 PLC- δ 1 PH ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

(2). PLC- δ 1 PH ドメインの基質結合活性評価法の確立

これまでの PLC- δ 1 PH ドメインの基質結合活性解析では、放射性同位体標識基質を用いたゲルろ過法、カロリメトリー法や表面プラズモン共鳴法などの高価な機器を用いた解析法が主であった。しかし、我々は多数の変異体における基質結合活性を迅速に解析する必要性が生じたため、より簡便かつ低コストで PLC- δ 1 PH ドメインの活性評価法の確立を試みた。

PLC- δ 1 PH ドメインの基質である IP_3 は、極めて負電荷の高い低分子であるため、タンパク質に結合すると、その複合体の総負電荷量が増加すると予想される。このことから、 IP_3 結合の有無でタンパク質の電気泳動度が異なることが期待された。そこで、非変性状態で電気泳動を行う Native-PAGE 法を用い

て PLC- δ 1 PH ドメインの IP_3 滴定実験を行ったところ、 IP_3 の濃度上昇に伴い、明確なゲルシフト現象が観察された (図 2, inset)。この IP_3 依存ゲルシフトは、 IP_3 結合活性が失われている K57A 変異体では観測されないことから、このゲルシフト現象は IP_3 の特異的結合に伴う負電荷量増加によって生じることが分かった。これにより、PLC- δ 1 PH ドメインの IP_3 結合活性が Native-PAGE 法により評価出来ることを証明した。野生株のゲルバンド強度の解析から、 IP_3 依存ゲルシフトにおける 50% 効果濃度 (EC_{50}) 値は 8.4 μM であった。

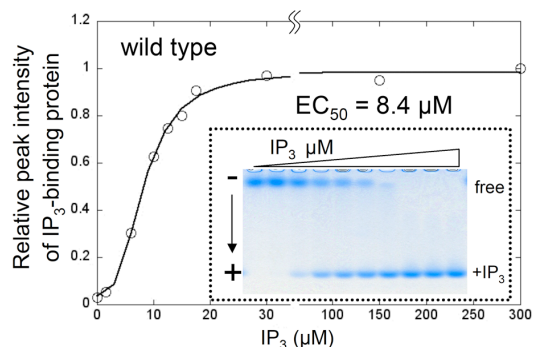


図 2 PLC- δ 1 PH ドメインの Native-PAGE による IP_3 滴定解析

また我々は、加熱変性により凝集したタンパク質がゲルウェル上に停まったまま泳動されない現象に着目し、様々な温度で加熱処理したタンパク質試料を電気泳動し、バンド強度解析を行うことで変性温度を評価出来ることを明らかにした。この変性温度は、基質結合によって上昇することも明らかとなった。これは、ゲルシフトを起こさない中性基質の場合でも、Native-PAGE 法による変性温度解析を行うことで、基質結合活性を評価できることを示している。

(3). PLC- δ 1 PH ドメインの分子内アロステリック相互作用

PLC- δ 1 PH ドメインの IP_3 結合部位は既に X 線結晶構造解析により同定されているが、 IP_3 存在下における $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys 標識野生株の ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトルでは、全ての Lys 残基に化学シフト変化が観測された (図 1)。これは IP_3 の特異的・非特異的結合に伴って、タンパク質全体に変化が誘起されていることを示している。タンパク質全体に変化を及ぼす現象は、一部の Lys 置換変異体の NMR 解析でも観測され、主に Lys30、Lys32、Lys43 および Lys57 が、PLC- δ 1 PH ドメイン分子内におけるアロステリック相互作用ネットワークを媒介していることが明らかとなった (図 3)。 IP_3 結合に伴うタンパク質分子全体の変化はこのネットワークを介していると考えられる。

興味深いことに、 IP_3 結合部位から離れている $\alpha 2$ ヘリックス (残基 82-87) に位置す

る Lys86 の広幅化した信号は、IP₃ 結合に伴って先鋭化することも明らかとなった (図 1, inset)。一方、不活性変異体 K57A においても、野生株よりは変化は小さいものの、IP₃ の添加によって、多くの Lys 残基の信号シフトが観察されることから、非特異的 IP₃ 結合も化学シフト変化に影響していることも明らかとなった。しかし、K57A では Lys86 信号の IP₃ 依存先鋭化はほとんど起らないことから、IP₃ 存在下で起こる Lys86 信号の変化は、特異的 IP₃ 結合によって誘起されていること、また Lys57 側鎖の存在が不可欠であることが明らかとなった。これは、互いに離れた位置に存在する Lys57 (β 3- β 4 ループ) と α 2 ヘリックスとの間に IP₃ 分子を介した分子内アロステリック相互作用が存在することを示している。一方、 α 2 ヘリックス構造を形成する水素結合を除去した K86P 変異体では、基質結合能が著しく低下し (EC₅₀ = 17.3 μ M)、K86A 変異体では基質結合能が野生株様 (EC₅₀ = 9.1 μ M) に回復することから、 α 2 ヘリックス構造が IP₃ 結合能に重要であることが明らかとなった。

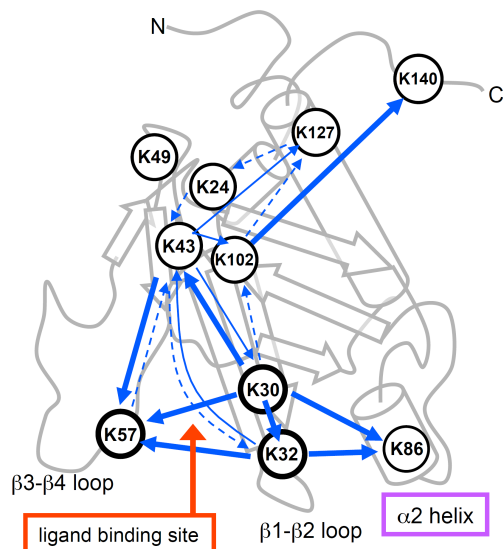


図3 PLC- δ 1 PH ドメインの分子内情報伝達ネットワーク

PLC- δ 1 PH ドメインの結晶構造から、IP₃ 結合に直接関与する β 1- β 2 ループには、 α 2 ヘリックスに位置する Phe87 側鎖フェニル環が面していることが分かっている。そこで、IP₃- α 2 ヘリックス間相互作用経路に、Phe87 側鎖が媒介している可能性が示唆されたため、Phe87 変異体の解析を行った。その結果、Phe87 のフェニル環を除去した F87A 変異体では、IP₃ 結合活性が著しく低下するのに対し (EC₅₀ = 12.3 μ M)、フェニル環を有する F87Y 変異体では野生株様活性を示した (EC₅₀ = 8.3 μ M)。F87A 変異体の NMR 解析では、Lys86 の信号の著しい広幅化により信号が観測されず、IP₃ を添加しても先鋭化が見られないのに対し、F87Y 変異体では野

生株様の変化を示した (図 4)。これらの結果から、Phe87 側鎖フェニル環が、IP₃- α 2 ヘリックス間相互作用を媒介し、IP₃ 結合に伴う α 2 ヘリックスの安定化に寄与していることが明らかとなった。

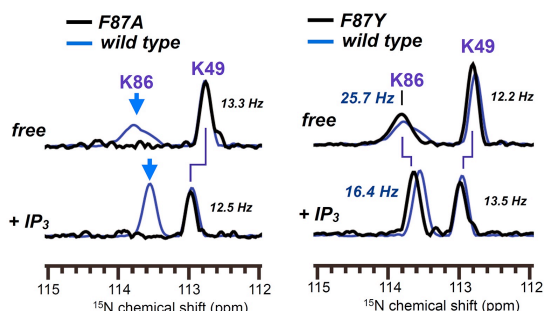


図4 [α -¹⁵N]Lys 標識 PLC- δ 1 PH ドメイン変異体 F87A および F87Y の ¹⁵N 側投影スペクトル (Lys86、Lys49 領域)。

また野生株の IP₃ 滴定実験において、Lys43 の NMR 信号が、他の Lys 残基とは異なり二段階 (三サイト) の化学シフト変化が起こることを発見した。この二段階シフトは、K57A では起こらないことから、IP₃ の特異的結合によって誘起されるものと考えられた。Lys43 は IP₃ 結合に直接関与しないことが結晶構造から明らかとなっているが、Lys43 に隣接する Tyr42 側鎖 OH 基が、IP₃ と間接的に水素結合をしていることが分かっている。そこで、Tyr42 側鎖を置換した変異体、Y42A、Y42G および Y42F の解析を試みた。Y42A および Y42G は、タンパク質精製の過程で著しく凝集し、基質結合活性解析に至らなかった。一方、Y42F 変異体は極めて安定に精製でき、かつ IP₃ 結合活性も正常であった。また Y42F では、Lys43 の二段階シフトは見られなかった。これらの結果は、Tyr42 側鎖 OH 基が、IP₃ 結合能には寄与しないが、IP₃-Lys43 間のアロステリック相互作用を媒介していること、さらに Tyr42 側鎖フェニル環が、タンパク質分子の安定化に寄与していることを示している。

(4). 単量体 M-フィコリン基質結合ドメインの活性解析と NMR 信号帰属

M-フィコリンは、病原体表面の糖鎖 GlcNAc を認識するフィブリノーゲン様ドメインと、補体活性を誘起する酵素 MASPs と相互作用するコラーゲン様ドメインを有するタンパク質で、生体中で三量体を基本とする多量体を形成している。我々は既に、三量体 M-フィコリン基質結合ドメイン (FD1) の結晶構造を報告しているが (③)、基質認識に伴う分子内情報伝達機構を調べるためには、NMR による解析が不可欠であると考えた。しかし、三量体 FD1 では分子量が約 80 kDa と通常の溶液 NMR による解析は困難であることから、単量体 FD1 の安定同位

体標識試料を調製し、その GlcNAc 結合活性の確認と NMR 信号の帰属を試みた。

FD1 の GlcNAc 結合活性は、His251、His284 および His297 に依存していること (⑦)、また単量体 FD1 は、三量体 FD1 に比べ、GlcNAc 結合活性が著しく低下していることを既に我々は報告している (③、⑨)。一方、単量体 FD1 においても His 残基依存 GlcNAc 結合活性を有しているかは不明であった。そこで、弱い相互作用の解析に適している弱親和性クロマトグラフィーの一種である ZAC 法を用いて、単量体 FD1 の His 変異体の解析を試みた。その結果、単量体 FD1 においても、三量体 FD1 と同様に His251、His284 および His297 が GlcNAc 結合活性に不可欠であることが明らかとなった。

また、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識単量体 FD1 の NMR 信号帰属を試みたところ、約 9 割の帰属に成功した。化学シフトより予想した二次構造は、X 線結晶構造解析による二次構造とほぼ一致したことから、溶液中の単量体 FD1 と結晶構造の三量体 FD1 の立体構造はほぼ一致すると考えられる。今後、この帰属を基に、FD1 分子内情報伝達経路が明らかになることが期待される。

<引用文献>

- ① [Tanio et al., \(1999\) *Biophys.J.* 77, 431-442.](#)
- ② [Tanio et al., \(1999\) *Biophys.J.* 77, 1577-1584.](#)
- ③ [Tanio et al., \(2007\) *J. Biol. Chem.* 282, 3889-3895.](#)
- ④ [Tanio et al., \(2008\) *Anal. Biochem.* 373, 164-166.](#)
- ⑤ [Tanio et al., \(2009\) *Anal. Biochem.* 386, 156-160.](#)
- ⑥ [Tanio et al., \(2009\) *Mol. Immunol.* 47, 215-221.](#)
- ⑦ [Tanio & Kohno \(2009\) *Biochem J.* 417, 485-491.](#)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1). [Tanio, M., Kusunoki, H., and Kohno, T. \$^1\text{H}\$, \$^{13}\text{C}\$ and \$^{15}\text{N}\$ backbone resonance assignments of the monomeric human M-ficolin fibrinogen-like domain secreted by *Brevibacillus choshinensis*, *Biomol. NMR Assign.*, 8, 207-211 \(2014\) 査読有 DOI: 10.1007/s12104-013-9484-4](#)
- (2). [Tanio, M., and Nishimura, K. Intramolecular allosteric interaction in the phospholipase C- \$\delta\$ 1 pleckstrin homology domain, *Biochim. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics*, 1834, 1034-1043 \(2013\) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.034](#)

- (3). [Tanio, M., and Nishimura, K. Analysis of the phospholipase C- \$\delta\$ 1 pleckstrin homology domain using native polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 431, 106-114 \(2012\) 査読有 DOI: 10.1016/j.ab.2012.09.012](#)

[学会発表] (計 8 件)

- (1). [谷生道一、楠英樹、河野俊之、Preparation of secretory proteins produced by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study、第 52 回 NMR 討論会、2013 年 11 月 12-14 日、金沢](#)
- (2). [谷生道一、西村勝之、NMR analysis of intramolecular allostery in the PLC- \$\delta\$ 1 PH domain、第 52 回 NMR 討論会、2013 年 11 月 12-14 日、金沢](#)
- (3). [谷生道一、西村勝之、PLC- \$\delta\$ 1 PH ドメインの分子内アロステリー、日本生物物理学会第 51 回年会、2013 年 10 月 28-30 日、京都](#)
- (4). [谷生道一、西村勝之、ホスホリパーゼ C- \$\delta\$ 1 PH ドメインにおける分子内アロステリック相互作用、日本蛋白質科学会第 13 回年会、2013 年 6 月 12-14 日、鳥取](#)
- (5). [谷生道一、西村勝之、PLC- \$\delta\$ 1 PH ドメインのタンパク質分子内情報伝達、第 40 回生体分子科学討論会、2013 年 6 月 7-8 日、大阪](#)
- (6). [谷生道一、西村勝之、NMR and Native-PAGE analyses of the phospholipase C- \$\delta\$ 1 pleckstrin homology domain、第 51 回 NMR 討論会、2012 年 11 月 8-10 日、名古屋](#)
- (7). [谷生道一、西村勝之、The short \$\alpha\$ 2-helix of the phospholipase C- \$\delta\$ 1 pleckstrin homology domain contributes to stable IP₃ binding、日本生物物理学会第 50 回年会、2012 年 9 月 22-24 日、名古屋](#)
- (8). [谷生道一、西村勝之、The short \$\alpha\$ 2-helix of the phospholipase C- \$\delta\$ 1 pleckstrin homology domain stabilizes the protein-IP₃ interaction、日本蛋白質科学会第 12 回年会、2012 年 6 月 20-22 日、名古屋](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷生 道一 (TANIO MICHIKAZU)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：10416662