

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07301

研究課題名(和文)GPCRシグナル調節因子スピノフィリンとGPCRとの相互作用の構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structural analysis of the interaction between spinophilin, a GPCR-signaling modulator, with GPCR

研究代表者

若松 馨 (Wakamatsu, Kaori)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：40222426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プルダウンとNMRによる解析でスピノフィリン(SPL)と α 2アドレナリンレセプター(ADR)分子中の相互作用部位を決定した(SPLは74残基, ADRは19残基)。ADRペプチドはアミロイドを形成する傾向が強かったが、濃縮や滴定中にタグを付けたADRを用い、オスモライトを添加することで、アミロイド化を防止することができた。15NラベルしたSPLをADRで滴定しHSQCスペクトルの記録に成功した。小さいが有意なシグナル変化が観測されたことから、SPLの主鎖に大きな構造変化が起きていないことが分かった。本研究で開発した方法はアミロイドを形成しやすいタンパク質の解析に広く応用可能であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガンや精神疾患に関与するタンパク質は他のタンパク質と相互作用することでその機能を発揮することが多い、そこでタンパク質どうしの相互作用を解析することは医学的・薬学的に重要であるが、相互作用する2種のタンパク質を混合した時に凝集したり、アミロイドを形成してしまい、相互作用を解析できないことがしばしば起こる。本研究で開発した方法はこのような問題を回避できるので、創薬の基礎的研究を推進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：By pull-down and NMR analyses, we determined the segments in spinophilin (SPL) and α 2-adrenergic receptor (ADR) molecules that are involved in mutual interaction: 74 and 19 amino acid residues for SPL and ADR, respectively. Although ADR peptide exhibited strong tendency to form amyloid fibrils, we succeeded in preventing the amyloid formation by employing tagged ADR peptide, by adding osmolyte during concentration and titration, and by paying various precautions. [15N]SPL was titrated with non-labeled ADR and 15N-1H HSQC spectra were recorded successfully. Small but significant signal changes were observed on addition of ADR, indicating that the structural changes in the main chain of SPL is small. We are now analyzing the side chain signals of SPL by using 13C-labeled SPL, because the interaction between the two molecules is expected to be mainly of ionic nature. The strategy we developed in this study would be widely applicable for proteins that tend to form amyloid fibrils.

研究分野：構造生物学

キーワード：凝集 アミロイド オスモライト NMR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スピノフィリン (SPL) はシナプス後肥厚に豊富に局在するリン酸化タンパク質で、アクチン線維との結合を介して他のタンパク質を細胞膜に局在化させる足場タンパク質の機能を有する。SPLは各種Gタンパク質共役受容体 (GPCR) と結合し、GPCR kinase と競合するので、GPCR のリン酸化やその後の MAPK 活性を阻害する。また、SPL は RGS とも結合することが知られており、SPL は GPCR を介するシグナリングを微調整すると考えられている。しかし、(1) SPL のどのアミノ酸残基が GPCR のどのアミノ酸残基と結合するのか、(2) 結合した時にどのような立体構造を形成するのか、また、(3) それらの相互作用は GPCR に共通なのか・多様性があるのか、などは全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

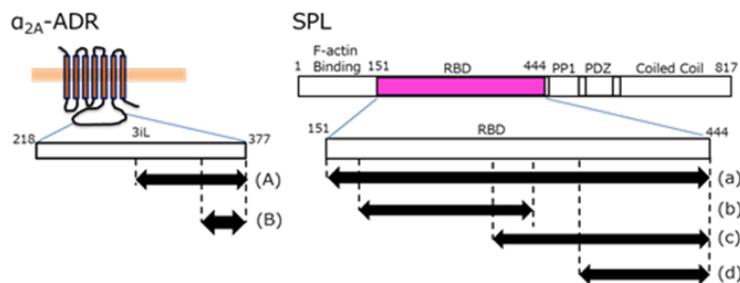
(1) SPL のどのアミノ酸残基が GPCR のどのアミノ酸残基と結合するのか、(2) 結合した時にどのような立体構造を形成するのか、また、(3) それらの相互作用は GPCR に共通なのか・多様性があるのか、などを解明する。

3. 研究の方法

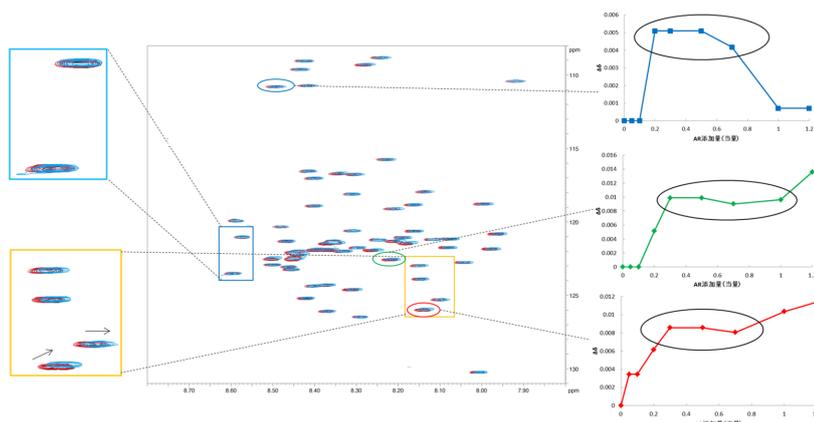
SPL および α_2 アドレナリンレセプター (ADR) について長さの異なるタンパク質を準備し、pull down assay および NMR による相互作用により、結合部位を決定する。また、NMR による titration により、相互作用するアミノ酸残基を特定するとともに、結合の強さを解析する。更に、複合体の構造を解析する。

4. 研究成果

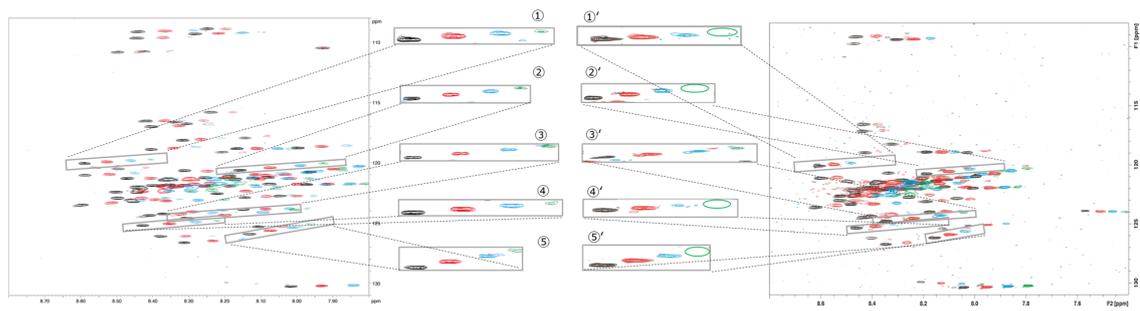
プルダウンと NMR による解析で SPL と ADR 分子中の相互作用部位を決定した。SPL は 74 残基 (下図(d))、ADR は 19 残基 (下図(B)) まで絞り込めた。



ADR ペプチドはアミロイドを形成する傾向が強かったが、濃縮や滴定中にタグを付けた ADR を用い、オスモライトを添加することで、アミロイド化を防止することができた。15N ラベルした SPL を ADR で滴定し HSQC スペクトルの記録に成功した。小さいが有意なシグナル変化が観測された (下図)。



また、温度上昇に伴って強度が大きく減少するシグナルと減少の程度が弱いシグナルがあった(下図)。後者のシグナルは ADR との相互作用や SPL の構造形成に関与していると考えられる。



本研究で開発した方法はアミロイドを形成しやすいタンパク質の解析に広く応用可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若松馨, 浦野智子, 島崎安希子, 宮下祐美, 黒川優香, 細田和男, 寺脇慎一
2. 発表標題 GPCRモジュレーター-spinophilinとアドレナリン受容体細胞内ループとの相互作用解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦野智子, 島崎安希子, 宮下祐美, 細田和男, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 GPCRシグナリング抑制因子Spinophilinとアドレナリン受容体との結合領域の絞り込みと相互作用解析
3. 学会等名 第56回NMR討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒川優香, 葛貫絵梨奈, 浦野智子, 島崎安希子, 河野俊之, 細田和男1, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 アドレナリン受容体細胞内第三ループとGPCRモジュレーター-Spinophilinとの相互作用解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----