

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 4日現在

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570191
 研究課題名（和文） 生体膜上における PIP3 結合蛋白質ドメインの高次構造転移と情報伝達機能の制御
 研究課題名（英文） Membrane induced alterations of structure and signal transduction mechanism in the PIP3-binding domains
 研究代表者
 辻 暁 (TUZI SATORU)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
 研究者番号：60227387

研究成果の概要（和文）：蛋白質の生体膜結合を制御するドメインとして大きなドメインファミリーをなす Pleckstrin homology (PH)ドメインに注目し、脂質二重膜結合時に生じる高次構造の変化を固体 NMR、CD、および蛍光分光法により解析した。分光解析の結果、細胞内情報伝達等に関与する蛋白質 SWAP-70 の PH ドメインは脂質膜上において水溶液中と異なる高次構造をとり、その二次構造転移が細胞内局在等の生理機能の調節に関与していることが見いだされた。

研究成果の概要（英文）： Conformations of the pleckstrin homology (PH) domain in solution and at the membrane surface were examined by using solid-state NMR, circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy. The PH domains form one of the largest domain families known to regulate membrane association of host proteins. Drastic conformational alterations including a transition of the secondary structure were detected for the membrane-bound PH domain of a signal transduction protein SWAP-70. These conformational alterations induced at the membrane surface are suggested to regulate functions of SWAP-70, such as intracellular relocalization in response to the cellular signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達、固体 NMR 分光法、PH ドメイン

1. 研究開始当初の背景

近年、X線結晶構造解析、溶液 NMR 分光法等の手法により多くの蛋白質の立体構造が決定され、結晶中および水溶液中における構造と機能の関係が解析されている。しかし、生体膜系（脂質二重膜系）の表面に結合した際の蛋白質の構造と、それに基づく分子間相

互作用の機構に関する知見は、このような系における構造情報を得る手法が確立していないことにより、非常に限られている。報告者らは、研究開始の時点で固体 NMR 分光法を用い脂質二重膜の表面に会合した脂質結合蛋白質の構造をアミノ酸残基レベルで検出、解析できることを見いだしていた。(Tuzi

et al., J. Biol. Chem. (2003) 278, 28019-28028, Uekama et al. FEBS J.(2007) 274, 177-187)。これらの背景をふまえ、生理的機能に応じて細胞質-細胞膜-核内を移動して細胞内信号伝達、細胞骨格制御等に関与する SWAP-70 の PH ドメインに注目し、その脂質二重膜上での構造と、細胞内における局在および機能の制御の関連を、固体 NMR 等の分光法により得られる構造情報を基に明らかにすることを旨とした。

2. 研究の目的

SWAP-70 の PH ドメインは、ホスファチジルイノシトール (3,4,5) 三リン酸 (PIP3) 頭部への選択的結合により、SWAP-70 を細胞質から細胞膜表面へ局在させる。また、SWAP-70 は、PH ドメイン中の核移行シグナル配列に依存して核内へ移行することが知られている。さらに、他の GEF 蛋白質では、PH ドメイン-GEF 活性ドメイン (DH) 間の相互作用の変化が細胞膜上において GEF 活性を誘起することが示されている。これらのことをふまえ、脂質膜表面での PH ドメインの構造が SWAP-70 の細胞中における機能にどのように影響するかを解析することを目的として研究を行った。研究目的は、以下の三項目にまとめられる。

- (1) 脂質二重膜表面に結合したときの SWAP-70 PH ドメインの立体構造変化を明らかにする。
- (2) 脂質二重膜上での SWAP-70 PH ドメインの構造変化のメカニズムと制御機構を解明する。
- (3) 脂質二重膜上で誘起される SWAP-70 PH ドメインの立体構造の、SWAP-70 の生理的機能への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

SWAP-70 PH ドメインに ^{13}C 安定同位体標識アミノ酸を導入し、水溶液中および生体膜をモデル化した脂質二重膜ベシクルに結合した状態に関して、固体 ^{13}C NMR 分光法等による構造解析を行う。水溶液中と脂質膜結合状態の PH ドメインの NMR スペクトルの比較をすることで、脂質膜上で誘起される構造変化を特定する。SWAP-70 PH ドメインと類縁の Def6 PH ドメインについても同様の解析を行い比較する。

- (1) 安定同位体標識 SWAP-70 PH ドメインおよび Def6 PH ドメインの調製: 大腸菌大量発現系を用い、SWAP-70 PH ドメインおよび Def6 PH ドメインを発現、精製する。大腸菌培養時の培地に ^{13}C 安定同位体標識アミノ酸を加えることで、PH ドメイン中の特定の残基に ^{13}C 同位体標識を導入する。
- (2) PH ドメイン-基質 (IP4 および PIP3) 結合親和性の定量: 水溶液および脂質膜結合

状態における PH ドメインの分光測定条件を決定するために、水溶性基質 IP4 および脂質二重膜ベシクル中の基質である PIP3 に対する解離定数 (K_d) を測定する。脂質膜中の基質に対する K_d の測定法として、SUV を用いたベシクル共沈殿実験を行う。

(3) PH ドメイン-脂質二重膜結合試料の調製: SWAP-70 および Def6 PH ドメインの特異的結合基質である PIP3 を含む脂質二重膜ベシクルを調製し、上記(1)で調製した ^{13}C 標識 PH ドメインと混合することにより、 ^{13}C 安定同位体標識 SWAP-70 PH ドメイン-脂質二重膜会合試料を調製する。混合比は、上記(2)で評価した K_d に基づいて決定する。PH ドメイン-脂質二重膜会合試料は、緩衝溶液に懸濁した状態で分光測定用試料管中に導入し、NMR、CD および蛍光測定を行う。

(4) 水溶液中および脂質二重膜結合状態における SWAP-70 PH ドメインおよび Def6 PH ドメインの固体 ^{13}C NMR、CD、および蛍光分光測定: SWAP-70 PH ドメインについて、水溶液中において PIP3 頭部に対応する構造をもつ IP4 と結合した状態、および、(3)において調製した PIP3 を含む脂質二重膜ベシクルに結合した状態の試料を用意する。各試料の PH ドメイン中の ^{13}C 標識アミノ酸残基由来のスペクトルを固体 ^{13}C NMR 測定により観測し、個々の残基のコンホメーションおよび運動性を決定し、脂質膜への結合により誘起される SWAP-70 PH ドメインの構造変化の検出を行う。また、非標識の PH ドメインについて、CD および蛍光分光測定を行い、水溶液中と脂質膜結合状態における PH ドメインの二次構造と蛍光アミノ酸残基

(Trp 残基) 周囲の環境の変化を解析する。

(5) 部位特異的変異導入 PH ドメインを用いたスペクトルの帰属および構造変化に関与する部位の特定: PH ドメイン中において分光観測の対象となるアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、各種の分光スペクトル中の個々の残基由来の信号を帰属する。帰属された信号から、脂質膜結合による PH ドメインの局所構造の変化を解析する。さらに、PH ドメインの構造変化機構に関与すると予測される部位のアミノ酸残基を変異することによる構造変化の挙動への影響を解析し、脂質膜上で誘起される PH ドメインの構造変化の機構を解析する。

4. 研究成果

(1) 脂質二重膜結合による SWAP-70 PH ドメインの立体構造転移: 水溶液中および脂質二重膜ベシクル中の PIP3 (ホスファチジルイノシトール (3,4,5) 三リン酸) に結合した SWAP-70 PH ドメイン (図 1) について CD、蛍光および NMR スペクトルを測定した結果、SWAP-70 PH ドメインは、結合基質の認識によ

り水溶液中から脂質二重膜表面に結合した際に、二次構造の転移を伴う大きな立体構造変化を生じることが見いだされた。

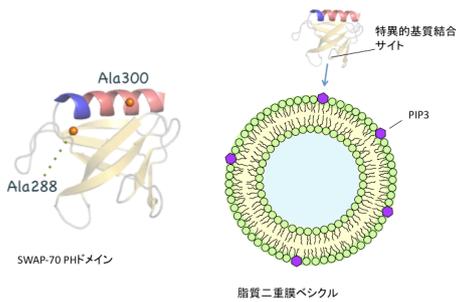


図1 SWAP-70 PH ドメインの立体構造

水溶液中における SWAP-70 PH ドメインの遠紫外領域（波長 200–250 nm）の CD スペクトルは、溶液 NMR により示されている β サンドイッチのコア構造と C 末端部位の α ヘリックス構造からなる二次構造を反映した線形を与える（図 2：黒実線）。脂質二重膜ベシクル中の PIP3 頭部に結合し、脂質二重膜表面に結合した際の CD スペクトルは、図 1 に示すように 200 nm 付近および 230 nm 付近に大きな変化を示した（図 2：青実線）。

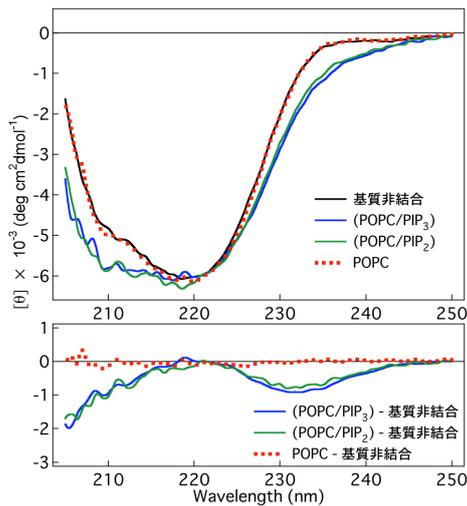


図2 SWAP-70 PH ドメインの CD スペクトル

このスペクトル変化は、脂質二重膜ベシクル表面において SWAP-70 PH ドメインの α ヘリックス構造が減少し、ランダムコイル構造が増加することを示している。このような二次構造の転移は、水溶液中において PIP3 の水溶性アナログである IP4 に結合した際には生じない（図 2：赤点線）。このことは、脂質二

重膜に結合したときに観測される立体構造変化が、基質 (PIP3 または IP4) の SWAP-70 PH ドメインの基質特異的結合サイトへの結合により生じるものではないことを示している。基質による特異的基質結合サイトへの結合に加え、異なるサイトを介した SWAP-70 PH ドメイン-脂質二重膜間の相互作用により、PH ドメインの立体構造変化が誘起されると考えられる。

SWAP-70 PH ドメイン中の Trp 残基の蛍光スペクトルは、脂質二重膜への結合により強度の増強と蛍光ピーク波長の長波長シフトを示した。この変化は、CD により観測される脂質膜上における二次構造転移に対応する Trp 残基周囲の環境変化を反映すると考えられる。

脂質二重膜結合時の立体構造変化をより詳細に解析するために、残基個々のレベルで主鎖構造の変化を観測しうる NMR 分光法による解析を行った。SWAP-70 PH ドメイン中の Ala 残基側鎖メチル炭素に ^{13}C 安定同位体標識を導入し、立体構造の観測プローブとした。Ala 残基側鎖メチル炭素の ^{13}C NMR スペクトルの信号位置は、残基の主鎖二面角を反映して変化することが知られている。SWAP-70 PH ドメインの C 末端 α ヘリックス中央に位置する Ala300 および α ヘリックスの N 末端近傍に位置する Ala288 の信号は、水溶液中ではそれぞれ α ヘリックスおよび β シート構造に対応する化学シフト値を持つ先鋭な NMR 信号を与えるが、脂質二重膜ベシクルに結合した状態における固体 ^{13}C NMR スペクトルでは、Ala300 はランダムコイル構造を示す化学シフト (16.7 ppm) の信号を与え、Ala288 はより典型的な β シート構造に対応する信号 (21.2 ppm) を与える（図 3）

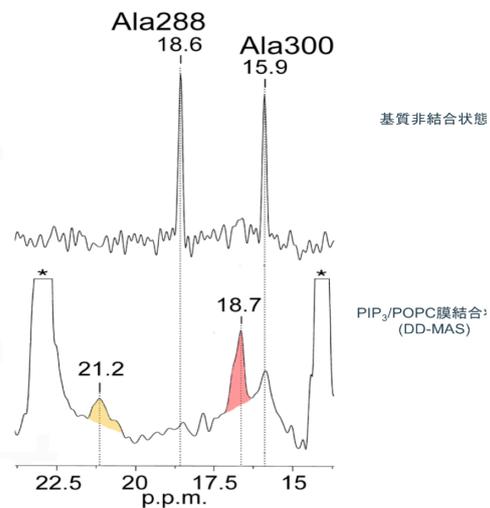


図3 水溶液中（基質非結合状態：上）および脂質二重膜結合状態（PIP3/POPC 膜結合状

態：下) の $[3-^{13}\text{C}]$ Ala 標識 SWAP-70 PH ドメインの ^{13}C NMR スペクトル

以上の分光測定より、SWAP-70 PH ドメインは、水溶液中から脂質二重膜に結合した際に、脂質膜との相互作用により C-末端 α ヘリックス部位のランダムコイル構造への転移を含む大きな高次構造変化を生じることが明らかになった。(図4)

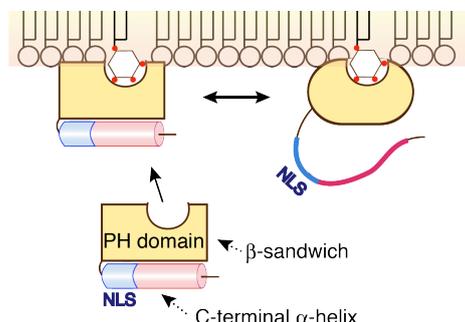


図4 脂質二重膜上で誘起される PH ドメインの高次構造変化の模式図

PH ドメインは構造モジュールとして細胞内情報伝達、細胞骨格制御などの重要な細胞機能に関わる蛋白質中に数多く見出される。この点は、PH ドメインを特徴づける立体構造の安定性が高く、脂質膜中の特異的基質の認識、結合等の機能を担う骨格構造として適していることを示している。これまでに、生理的条件に近い条件下で PH ドメインの骨格構造をなす β サンドイッチ構造と C 末端 α ヘリックス構造が二次構造レベルで大きく変化する例は報告されていない。本研究では、SWAP-70 PH ドメインについて、基質である PIP3 を認識し、脂質二重膜表面に結合した際に、蛋白質-脂質膜間相互作用により、骨格構造の一部である C 末端の α ヘリックスがランダムコイルに転移することを見出した。信号伝達のメッセンジャーである PIP3 の認識による脂質膜結合という SWAP-70 PH ドメイン本来の生理的機能に伴い、二次構造レベルの構造転移が生じるという知見は、PH ドメインの構造-機能相関についてこれまでに無い描像を与えるものとして重要である。また、本研究で構造変化が見出された α ヘリックス中には SWAP-70 の細胞核への移行を制御する核移行シグナル配列 (NLS) が存在しており、脂質膜上で誘起される α ヘリックス-ランダムコイル転移はシグナル配列の露出を介して SWAP-70 の核移行を促進すると考えられる。

(2) 脂質膜結合による Def6 PH ドメインの立体構造転移： SWAP-70 PH ドメインで観測さ

れた脂質二重膜結合時の二次構造転移が SWAP-70 PH ドメイン固有の特徴であるのかどうかを検討するために、SWAP-70 と類縁の蛋白質である Def6 に含まれ、SWAP-70 PH ドメインと相同性の高いアミノ酸残基配列を持つ Def6 PH ドメインについて PIP3 を認識して脂質二重膜に結合した際の立体構造変化を解析した。

Def6 PH ドメインの立体構造は決定されていないことから、溶液 NMR による二次構造解析およびレプリカ交換法を用いた分子動力学計算による立体構造モデルの構築を用いて、Def6 PH ドメインの立体構造モデルを作成した。Def6 PH ドメインは、SWAP-70 PH ドメインとほぼ一致する二次構造からなる高次構造を有することを確認した。SWAP-70 PH ドメインでは構造転移の生じる α ヘリックスに位置する核移行シグナル配列は、Def6 PH ドメインには存在せず、Def6 は細胞核へ移行しないことが知られている。

水溶液中および脂質膜結合状態における真空紫外 CD スペクトルは、Def6 PH ドメインの α ヘリックス含量が脂質膜への結合により変化しないことを示した (表1)。

表1 真空紫外 CD 測定より評価された Def6 PH ドメインの二次構造含量 (%)

	α helix	β strand	turn	unordered
基質費結合状態	17.3	38.7	22.1	20.1
PIP3/POPC ベシクル結合状態	17.3	35.8	22.7	22.8

$[3-^{13}\text{C}]$ Ala 標識 Def6 PH ドメインの ^{13}C NMR スペクトルは、脂質膜結合時に β サンドイッチ構造が SWAP-70 PH ドメインと類似の構造変化をしていること、および C 末端 α ヘリックスの構造にも変化が生じることを示したが、SWAP-70 PH ドメインで観測された α ヘリックス-ランダムコイル転移は見出されなかった。

これらのことから、SWAP-70 PH ドメインで見出された脂質膜結合時における構造転移は、SWAP-70 PH ドメインの機能と関連する SWAP-70 PH ドメインに特有の構造的特徴であることが示唆された。

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1件)

- ① N. Tokuda, K. Kawai, Y. H. Lee (Osaka University), T. Ikegami (Osaka University), S. Yamaguchi, H. Yagisawa, Y. Fukui (National Health Research

Institutes, Taiwan), and S. Tuzi, Membrane-induced alteration of the secondary structure in the SWAP-70 pleckstrin homology domain, *J. Biochem.*, 2012, *151*, 391-401.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Naomi Tokuda, Michikazu Tanio, Katsuyuki Nishimura, Toshiyuki Kohno, Daisuke Yokogawa, Takahisa, Ikegami and Satoru Tuzi, Conformational properties of the Def6 PH domain located at the lipid bilayer surface, The 50th annual meeting of the biophysical society of Japan, 平成 24 年 9 月 22 日～24 日、愛知県
- ② Satoru Tuzi, Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University), Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan) and Hitoshi Yagisawa, Changes in the secondary structure of the SWAP-70 PH domain induced at the lipid bilayer surface, The 10th JBS Biofrontier Symposium: International Symposium New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, 平成 23 年 11 月 14 日～16 日、福岡県
- ③ Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami, Hitoshi Yagisawa (Osaka University), Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, A solid-state NMR study of structural alteration and function of the PH domain induced at the lipid bilayer surface, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011: the 50th memorial annual meeting of the nuclear magnetic resonance society of Japan, 平成 23 年 11 月 15 日～18 日、神奈川県
- ④ Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University), Hitoshi Yagisawa, Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, Conformational alteration of SWAP-70 PH domain induced at the membrane surface, The 49th annual meeting of the biophysical society Japan, 平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県
- ⑤ Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University),

Hitoshi Yagisawa, Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, A solid-state NMR study of structural alteration and function of the PH domain induced at the lipid bilayer surface, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011: the 50th memorial annual meeting of the nuclear magnetic resonance society of Japan, 平成 23 年 11 月 15 日～18 日、神奈川県

- ⑥ S. Tuzi, N. Tokuda, K. Kawai, Y. Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), H. Yagisawa; Conformational alterations of the pleckstrin homology domains at the lipid bilayer surface, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu 2010)、アメリカ合衆国、ハワイ。
- ⑦ 徳田尚美・八木澤 仁・福井泰久 (National Health Research Institutes, Taiwan)・辻 暁、固体 NMR 分光法による PH ドメインの脂質膜表面における構造変化の解析、第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月 7 日～10 日、兵庫県
- ⑧ 徳田尚美・川合克久・八木澤 仁・福井泰久 (National Health Research Institutes, Taiwan)・辻 暁、固体 NMR による脂質膜表面において誘起される SWAP-70 PH ドメインの構造変化および機能の解析、第 49 回 NMR 討論会、平成 22 年 11 月 15 日～17 日、東京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biophysics2/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 暁 (TUZI SATORU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号 : 60227387

(2) 研究分担者

八木澤 仁 (YAGISAWA HITOSHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号 : 40192380