

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590049

研究課題名(和文) 転写・スプライシング因子 PQBP1 のコネクター機能の検証

研究課題名(英文) Verification of the connector function of the transcription and splicing factor PQBP1

研究代表者

水口 峰之 (Mizuguchi, Mineyuki)

富山大学・医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：30332662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写・スプライシング因子PQBP1は、小さく折りたたまれたWWドメインと長大な変性領域で構成される。本研究では、PQBP1とスプライソソーム構成因子WBP11およびU5-15kDとの相互作用を定量的に解析した。さらに我々は、PQBP1がWBP11とU5-15kDに同時に結合することを示した。我々の結果は、スプライソソームにおいてPQBP1がコネクタータンパク質として機能することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The transcription and splicing factor PQBP1 is composed of a small folded WW domain and a long disordered region. In the present study, we quantitatively analyzed the interaction of PQBP1 with spliceosomal proteins WBP11 and U5-15kD using surface plasmon resonance technique. In addition, we also demonstrated that PQBP1 simultaneously binds to WBP11 and U5-15kD. Our results suggest that PQBP1 acts as a connector protein in spliceosome.

研究分野：物理系薬学

キーワード：タンパク質 天然変性蛋白質 解離定数 表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

Polyglutamine-tract binding protein 1 (PQBP1)は、WW ドメインを有する 265 アミノ酸残基のタンパク質である。WW ドメインの C 末端側は天然変性領域であり、特定の構造をとっていない。PQBP1 は核内に多く存在しており、スプライソソーム構成因子 U5-15kD に結合する。近年我々は、PQBP1 の C 末端領域と U5-15kD の複合体の立体構造を明らかにし、PQBP1 の YxxPxxVL モチーフが U5-15kD との結合に必須であることを明らかにした。一方、PQBP1 の WW ドメインは、スプライシング因子 WBP11 や歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の原因タンパク質 atrophin-1 に結合することがわかっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PQBP1 と WBP11、U5-15kD、atrophin-1 の結合を定量的に評価し、PQBP1 の機能についての知見を得ることである。

3. 研究の方法

WBP11、atrophin-1、PQBP1 は、His-tag と可溶性タグの Lipoyl ドメイン (LD) を N 末端側に付加した融合タンパク質とした。本研究で用いた His-tag と LD をもつ融合タンパク質は、LD-WBP11(455-466)、LD-WBP(455-469)、LD-atrophin-1(632-643)、LD-PQBP1(193-265)、LD-PQBP1(223-265) である。一方、U5-15kD(4-137)、全長 PQBP1、PQBP1(1-94)には、N 末端に His-tag のみを付加した。同様に、98-192 残基を欠損した変異体である PQBP1(Δ 98-192)、90-192 残基を欠損した変異体である PQBP1(Δ 90-192)、82-192 残基を欠損した変異体である PQBP1(Δ 82-192)にも His-tag を付加した。また、PQBP1(1-94)、U5-15kD(4-137)、LD、LD-PQBP1(193-265)、LD-PQBP1(223-265)、LD-WBP11(455-469)については、His-tag の N 末端側に biotinylation-tag を付加した融合タンパク質も

準備し、biotinylation-tag に含まれるリシン残基を biotin-protein ligase を用いてビオチン化した。

ビオチン化タンパク質は、ストレプトアビジン CM5 センサーチップ上に固定化した。表面プラズモン共鳴実験は、25°C、pH 8.5、流速 30 μ L/min の条件で行った。装置は BIACORE J を用いた。

4. 研究成果

以前に行われた研究によって、PQBP1 の WW ドメイン (PQBP1-WWD) が、WBP11(455-466)に結合すると報告されていた。WBP11(455-466)はプロリンに富んだ領域であり、その配列は PRLPPGPPPPGR である。本研究では、LD-WBP11(455-469)をストレプトアビジン CM5 センサーチップ上に固定化し、全長 PQBP1 との結合を定量的に評価した。解析の結果、解離定数 (K_D) は 13.8 μ M であった。同様に、PQBP1(1-94)および PQBP1(Δ 98-192)を用いて結合実験を行ったところ、全長 PQBP1 と比較して K_D 値に大きな差はなかった。一方、PQBP1(Δ 82-192)および PQBP1(Δ 98-192)では結合親和性が減少した。これらの結果から、PQBP1 が WBP11(455-46)に結合するには、WW ドメイン (48-82 残基)だけでなく、82-94 残基も重要であることがわかった。

次に、PQBP1 の点変異体を用いて同様の結合実験を行った。用いた点変異体は、PQBP1(1-94)の Y64C、Y64A、W66A、V73A、W75A 変異体である。これらの変異を導入することで、PQBP1(1-94)と LD-WBP11(455-469)の結合親和性が著しく低下したことから、PQBP1 と WBP11 の結合には、WW ドメインに位置する芳香族アミノ酸と疎水性アミノ酸の側鎖が重要であることがわかった。

センサーチップ上に固定化するタンパク質を PQBP1(1-94)とし、LD-WBP11(455-469)との結合を表面プラズモン実験で調べた。解析の結果、 K_D 値は 18 μ M であった。また、

LD-WBP11(455-469)のプロリンをアラニンに変異させて同様の結合実験を行ったところ、WBP11(455-469)のすべてのプロリンが結合に重要であることがわかった。また、LD-WBP11(455-466)では結合親和性が1/12に低下したことから、WBP11の467-469残基(PPG)も結合に重要であることがわかった。

以前に行われた研究では、PQBP1-WWDがatrophin-1の632-643残基に結合すると報告されている。本研究では、PQBP1(1-94)をセンサーチップ上に固定化し、atrophin-1(632-643)との結合を表面プラズモン共鳴で調べた。Atrophin-1(632-643)もプロリンに富んだ領域であり、その配列はSPPGPPPYGKRAである。表面プラズモン共鳴による結合実験の結果、PQBP1とLD-atrophin-1(632-643)の K_D 値は600 μ M程度であり、非常に弱い結合であることがわかった。

PQBP1のN末端側に位置するWWドメインはWBP11に結合し、PQBP1のC末端側に位置するYxxPxxVLモチーフはU5-15kDに結合することがわかっている。しかしながら、PQBP1のコネクター機能、すなわちPQBP1がWBP11とU5-15kDの両方に同時に結合するかどうかは明らかになっていない。そこで、表面プラズモン共鳴を用いてPQBP1のコネクター機能を検証した。この実験では、LD-WBP11(455-469)を固定化したセンサーチップに、PQBP1とU5-15kDを同時に加えてシグナルの強度を観測した。その結果、PQBP1とU5-15kDを同時に加えたときのシグナルは、PQBP1のみを加えたときよりも明らかに強いシグナルとなった。さらに、PQBP1の濃度が一定の条件下で、U5-15kDの濃度を変化させて測定したところ、U5-15kDの濃度が高いほどシグナル強度が増加した。これらの結果は、PQBP1がセンサーチップ上のWBP11に結合し、さらにU5-15kDにも結合していることを示しており、PQBP1はWBP11とU5-15kDを同時に結合するコネクター機能を有することが明らかとなった。

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 3件)

Nabeshima Y, Mizuguchi M, Kajiyama A, Okazawa H. Segmental isotope-labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1. *FEBS Lett.* 588: 4583-4589 (2014) doi: 10.1016/j.febslet.2014.10.028. (査読有)

Mizuguchi M, Obita T, Serita T, Kojima R, Nabeshima Y, Okazawa H. Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15 kD. *Nature Commun.*, 5: 3822 (2014) doi: 10.1038/ncomms4822. (査読有)

Mizuguchi M, Okazawa H. Structural study of polyglutamine tract-binding protein 1. *Yakugaku Zasshi*, 133:519-526 (2013). (査読無)

[学会発表](計 5件)

鍋島裕子, 水口峰之, 梶山亜沙希, 岡澤均. 天然変性蛋白質 PQBP1 のセグメント同位体標識. 日本薬学会北陸支部第126回例会; 2014 Nov 16; 金沢.

Mizuguchi M, Obita T, Serita T, Kojima R, Nabeshima Y, Okazawa H. Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD. IIAS Research Conference 2014, Chromatin Decoding; 2014 May 12-15; Kyoto, Japan.

水口峰之. セグメントラベル法によるタンパク質の重水素化, 平成25年度第2回生物構造学研究会 タンパク質の重水素化と中性子構造生物学; 2014 Mar 17; 東京.

水口峰之, 鍋島裕子: 天然変性蛋白質 PQBP1 のセグメント同位体標識; 第52回NMR討論会; 2013 Nov 12-14; 金沢市.

水口峰之, 鍋島裕子: 天然変性蛋白質 PQBP1 のセグメント標識. 第51回NMR討論会; 2012, Nov 8-10; 名古屋市.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phypha2/index-j.html>

6．研究組織

(1) 研究代表者

水口 峰之 (MIZUGUCHI MINEYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号：30332662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

帯田 孝之 (OBITA TAKAYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
准教授
研究者番号：30578696