

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25650024

研究課題名(和文) In-cell NMRによるリアノジン受容体のカルシウム放出制御機構の解明

研究課題名(英文) In-cell NMR study on regulatory mechanism of calcium release by ryanodine receptor

研究代表者

真板 綾子(MAITA, Ayako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特別研究員(RPD)

研究者番号：60415106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋小胞体上に存在するリアノジン受容体とその安定化蛋白質FKBP12との相互作用に着目し、この複合体によりカルシウム放出制御機構をIn-cell NMR法で明らかにすることを目指した。しかし、標的蛋白質を筋芽細胞へ導入する方法が確立できなかったため、当初の研究計画を変更し、ミトコンドリアのカルシウムの取り込みに関わる脱共役分子UCP3とその制御因子HAX-1に着目した構造生物学的研究を行った。一連の研究より、HAX-1のC末端側の領域は膜結合性を示し、カルシウムと結合することにより部分的なフォールディングが誘起され、UCP3と結合可能となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ryanodine receptor is the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. We tried to investigate the interaction between ryanodine receptor and its stabilizing factor, FKBP12, by in-cell NMR. However, we did not succeed to deliver the protein of interest to myogenic cells. Thus, I changed the originally planned research project for the study focused on the interaction the protein complex (uncoupling protein 3 (UCP3) and HAX-1) that was involved in the control of the calcium influx into the mitochondria. The NMR and CD experiments showed that calcium-induced folding and stabilization of the C-terminal region of HAX-1 enable it to interact with UCP3. Moreover, the NMR experiment using two different detergents suggested that the C-terminal region could bind to biological membrane.

研究分野：構造生物学

キーワード：カルシウム恒常性 NMR サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、老化に伴い骨格筋が萎縮する症状である。この症状の予防・改善に、運動トレーニングが有効であることは確認されているが、これまでに根治的な治療法はなかった。研究の当初、Andrew らのグループから、老齢マウスを用いた研究で、サルコペニア発症の原因が筋小胞体上に存在するリアノジン受容体 (RyR1) からの Ca^{2+} 漏出であることが報告された。活性酸素により障害を受けた受容体から、その安定化蛋白質 FKBP12 が解離することにより、 Ca^{2+} が漏出するというモデルが提唱された。さらに、薬剤 S107 が、障害を受けた受容体と FKBP12 との再結合を促し、 Ca^{2+} の漏出を防ぐことを明らかにした。この FKBP12 と RyR1 の相互作用の詳細に関しては、明らかになっていなかった。そこで、本申請課題で、FKBP12 と RyR1 の細胞内での相互作用を In-cell NMR (核磁気共鳴法) で検出することを目指した。しかし、細胞透過ペプチドを融合した標的タンパク質を筋芽細胞へ導入する操作の確立できなかったことと、この研究課題を推進する上で必要な薬剤である S107 が、特許及び創薬開発研究のために入手不可能であった。そこで、当初の研究計画を変更し、リアノジン受容体と同様に、加齢により Ca^{2+} 漏出がおり、サルコペニアの原因となるミトコンドリアの Ca^{2+} 漏出に着目し、この Ca^{2+} の取り込み制御に関わる複合体 (Ca^{2+} 単輸送体 UCP3 とその制御因子 HAX-1) に着目した構造生物学的研究を行った。

2. 研究の目的

過剰なミトコンドリア内の Ca^{2+} はミトコンドリアの機能障害を引き起こすことが知られている。近年、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込みは、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体 (MCU 複合体) が担っていることが明らかにされた。この複合体以外にも、ミトコンドリア内膜上にある脱共役蛋白質 UCP も、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 流入に関与する。私の所属する研究室では、UCP3 が Ca^{2+} 濃度依存的に HS-1-associated protein X-1 (HAX-1) と結合し、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みを制御することが見出した。しかしながら、これらのタンパク質の相互作用様式は明らかとなっていない。そこで私達は HAX-1 と UCP3 の相互作用について、構造生物学的手法を用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HAX-1 の UCP3 結合領域 (アミノ酸残基 211-280) の大量調製系の確立

本研究では、NMR 法を用いて、HAX-1 と UCP3 の相互作用様式を解析するため、まず、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の発現系構築・大量調製系の確立を行った。安定同位体標識のための培地を

用いて、GST タグと HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の融合蛋白質として大腸菌に発現させた。その後、アフィニティー精製、切断酵素 PreScission Protease による GST タグ切断、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを順に行い、目的の融合蛋白質を単離した。一方、UCP3 の HAX-1 結合領域 (ループ 2) に関しては、合成ペプチドを解析に用いた。

(2) HAX-1 と UCP3 の相互作用解析

まず、¹⁵N 標識した HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ と非標識の UCP3 ループ 2 の合成ペプチドとの NMR 滴定実験を行った。次に、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、両者の結合の強さを調べた。SPR 法では、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ をセンサーチップに固定し、アナライトとして UCP3 ループ 2 ペプチドを用いた。上記の二つの解析では、 Ca^{2+} および界面活性剤を含む溶媒を用いて行った。

(3) HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の Ca^{2+} 結合 (NMR 測定、円偏光二色性 (CD) 測定、等温滴定型カロリメトリー (ITC) 測定)

HAX-1 と UCP3 の結合には、 Ca^{2+} が不可欠であることが分子・細胞生物学的研究からすでに明らかになっていたため、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ が Ca^{2+} と直接結合しているか否かを調べた。まず、¹⁵N 標識 HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の試料に EDTA を添加し、 Ca^{2+} を除去した後に透析により EDTA を除去した。この試料の NMR 測定を行い、 Ca^{2+} 存在下のスペクトルと比較した。次に、CD 測定を行い、 Ca^{2+} 非存在下・存在下での HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の二次構造解析を行った。さらに、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の Ca^{2+} 結合の熱学的パラメーターを得るために、ITC 測定を行った

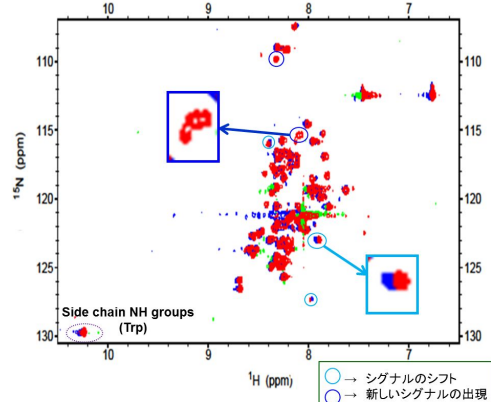
(4) HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の界面活性剤との結合

研究を行う過程で、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ が界面活性剤と結合する可能性が示唆された。そこで、二種類の異なる界面活性剤 (CHAPS, DPC) を用いて、¹⁵N 標識した HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の NMR 測定を行い、スペクトルの比較を行った。

4. 研究の成果

(1) HAX-1 と UCP3 の相互作用解析

図1. UCP3 ループ2ペプチド添加前後の¹⁵N HAX-1₂₁₁₋₂₈₀の二次元NMRスペクトルの比較

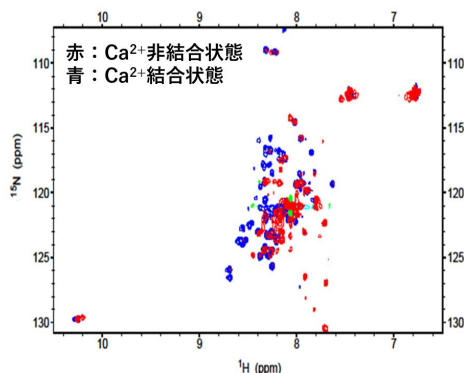


NMR 法では、UCP3 ループ2 ペプチド添加前後の ^{15}N -HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ のスペクトルを比較した結果、ペプチド添加に伴うシグナル変化が見られた(図1)。これより、両者が結合することを確認した。また、SPR 法では、センサーグラムのレスポンスが UCP3 ループ2 の濃度依存的に上昇したが、結合が弱いために、結合定数等のパラメーターを算出することができなかった。

(2) HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の Ca^{2+} 結合(NMR 測定、CD 測定、ITC 測定)

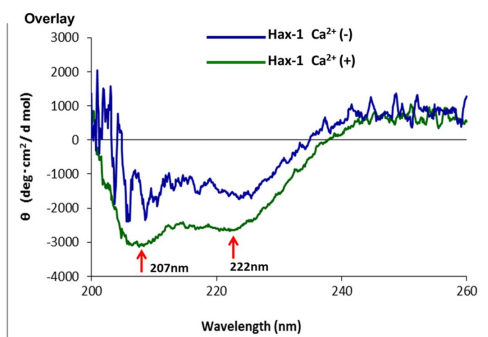
NMR 法では、 ^{15}N 標識した HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の Ca^{2+} 非存在下でのスペクトルを測定し、 Ca^{2+} 存在下のスペクトルと比較した結果、 Ca^{2+} 有無により著しいシグナル変化が見られた(図2)。

図2 ^{15}N HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ と Ca^{2+} との結合 [NMR法]



これより、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ と Ca^{2+} は直接的に結合することを明らかにした。また、 Ca^{2+} 非存在下でのスペクトルより、 Ca^{2+} 非結合状態では、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ は部分的なアンフォールド状態をとっていることが示唆された。次に、CD 測定では、 Ca^{2+} 存在下・非存在下における HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の CD スペクトルを測定した結果、 Ca^{2+} 結合状態の方では、ヘリクス含有量が増加し、立体構造が安定化する傾向が見られた(図3)。

図3 Ca^{2+} による HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の二次構造変化 [CDスペクトル]



これより、 Ca^{2+} 非存在下では、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ は部分的にアンフォールド状態にあり、 Ca^{2+} 結合によってフォールディングが誘導されることが示唆された。さらに、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀

の Ca^{2+} 結合の熱学的パラメーターを得るために、ITC 測定を行ったが、溶媒に含まれる高濃度の界面活性剤のために、正確な結果が得られなかった。

(3) HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ の界面活性剤との結合

HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ と生体膜の代替として用いられる界面活性剤との相互作用についても NMR 法を用いて検討した。二種類の異なる界面活性剤 (DPC・CHAPS) を用いて、それぞれ ^{15}N 標識した HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ を精製した後に、NMR 測定を行った。その結果、界面活性剤の違いにより、シグナル変化が見られた。また、ミセルサイズの大きい DPC 存在下での HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ のスペクトルでは、著しいシグナル強度の減弱が見られた。これより、HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ は界面活性剤と直接結合することが示唆された。

以上の解析から、以下のような仮説を提唱した。HAX-1 はミトコンドリア内膜と部分的に結合しており、 Ca^{2+} 濃度が低い状態では HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ は、 Ca^{2+} と結合しておらず、部分的なアンフォールド状態にある。しかし、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると HAX-1₂₁₁₋₂₈₀ は Ca^{2+} と結合し、フォールディングが引き起こされる。HAX-1 が細胞質 Ca^{2+} 濃度を感知する機構は明らかではないが、 Ca^{2+} 結合により起こる大きな立体構造変化によって UCP3 との結合が可能となり、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みが制御されると考えられる。

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 4 件)

英語名は、旧姓の Ohno を使用しております。

Abe T., Hirasaka K., Kohno S., Tomida C., Haruna M., Uchida T., Ohno A., Oarada M., Teshima-Kondo S., Okumura Y., Choi I., Aoyama T., Terao J., Nikawa T., Capric acid up-regulates UCP3 expression without PDK4 Induction in Mouse C2C12 Myotubes. J Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)., 査読有、Vol. 62, 2016, 32-39

Ohno A. Ochi A., Maita N., Ueji. T., Bando A., Nakao R., Hirasaka K., Abe T., Teshima-Kondo S., Nemoto H., Okumura Y., Higashibata A., Yano S., Tochio H., Nikawa T, Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin., Archives of Biochemistry and Biophysics, 査読有、Vol. 594, 2016, 1-7

Hirasaka K., Mills E. M., Haruna M., Bando A., Ikeda C., Abe T., Kohno S., Nowinski S. M., Lago C. U., Akagi K., Tochio H., Ohno A., Teshima-Kondo S., Okumura Y., Nikawa T., UCP3 is associated with Hax-1 in mitochondria in the presence of calcium ion., Archives of Biochemistry and Biophysics, 査読有、Vol. 472、2016、108-113

坂東亜紀、真板綾子、二川健、宇宙飛行と加齢による筋萎縮と栄養対策、アンチ・エイジング医学 日本抗加齢医学会雑誌、査読なし、9巻、2013、47-52

〔学会発表〕(計 10 件)

真板綾子、真板宣夫、奥村裕司、永野ひかる、次田早希、有田恭平、田畑考統、平坂勝也、安倍知紀、近藤茂忠、二川健、型膜貫通型セリンプロテアーゼ MSPL とペプチド性阻害剤との複合体結晶構造解析、第 39 回分子生物学会、2016.12.2、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Ohno A., Tsugita S., Hirasaka K., Haruna M., Ikeda C., Akagi K., Tochio H., Kondo S., Okumura Y., Nikawa T., Calcium-Dependent Interaction between UCP3 and HAX-1 XXIIth ICMRBS, Kyoto International Conference (京都府京都市), 2016.8.21

真板綾子、真板宣夫、次田早希、安倍知紀、平坂勝也、奥村裕司、近藤茂忠、二川健、廃用性筋萎縮原因酵素 Cbl-b と阻害ペプチド Cblin との複合体結晶構造解析、病態プロテアーゼ学会、2016.8.5、千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

次田早希、真板綾子、平坂勝也、赤木謙一、朽尾豪人、安倍知紀、近藤茂忠、奥村裕司、二川健、UCP3 と Hax-1 の相互作用様式の解明、第 16 回蛋白質科学会、2016.6.7、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

真板(大野)綾子、真板宣夫、奥村裕司、永野ひかる、次田早希、有田恭平、坂東亜紀、田畑考統、平坂勝也、安倍知紀、近藤茂忠、二川健、高病原性インフルエンザウィルス感染に関わる宿主酵素 MSPL とペプチド性阻害剤の複合体結晶構造、第 16 回蛋白質科学会、2016.6.7、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

次田早希、真板綾子、平坂勝也、坂下禎宏、井田くるみ、春名真里江、Floriane

Rudwill、安倍知紀、近藤茂忠、奥村裕司、二川健、HAX-1 と UCP3 の相互作用様式の解明、第 48 回 日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、2015.11.1、広島女学院大学(広島県・広島市)

次田早希、平坂勝也、奥村裕司、安倍知紀、真板綾子、近藤茂忠、二川健、UCP3 と HAX-1 の相互作用様式の解明、第 20 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2015-8-22、ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋 (愛知県・名古屋市)

真板(大野)綾子、坂東亜紀、赤木謙一、朽尾豪人、平坂勝也、春名真里江、安倍知紀、近藤茂忠、奥村裕司、二川健、HAX-1 と UCP3 の Ca²⁺依存的な相互作用の解析、第 14 回日本蛋白質科学会、2014.6.26、横浜産貿ホール マリネリア (神奈川県・横浜市)

坂東亜紀、真板綾子、赤木謙一、朽尾豪人、湯浅茜、平坂勝也、池田千佳、春名真里江、近藤茂忠、奥村裕司、二川健、NMR(核磁気共鳴)法による UCP3 と HAX-1 の相互作用解析、第 14 回運動器科学研究会 2013.9.13 ヴィラフォンティーヌ汐留 (東京都・港区)

坂東亜紀、真板綾子、赤木謙一、朽尾豪人、湯浅茜、平坂勝也、池田千佳、春名真里江、近藤茂忠、奥村裕司、二川健、NMR(核磁気共鳴)法による UCP3 と HAX-1 の相互作用解析、UCP3 結合領域を介した HAX-1 と Ca²⁺の相互作用解析、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013.5.26、名古屋大学東山キャンパス (愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真板綾子 (MAITA, Ayako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特別研究員(RPD)

研究者番号：60415106

(4) 研究協力者

次田早希 (TSUGITA, Saki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部