

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840050

研究課題名(和文) 核ラミン変異体の網羅的な溶液NMR解析によるラミノパシーの病態生理の解明

研究課題名(英文) Comprehensive study of structure and dynamics of laminopathy-causing LMNA mutants for elucidation of Laminopathy

研究代表者

杉木 俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：70635698

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)：Lamin A (LMNA) 蛋白質は、核膜裏打ち蛋白質であり、細胞の生存や性状な増殖に重要な働きをしている。LMNA に突然変異が入ると、重篤な遺伝病ラミノパシーを引き起こすことが知られている。しかしその発症のメカニズムは未知な点が多い。

本研究で、Lamin A (LMNA)蛋白質について、安定同位体標識蛋白質の大量発現・精製法を確立し、溶液NMR法により、野生型および4種類のラミノパシー原因変異体の立体構造を高精度に決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to demonstrate how structural and physicochemical changes of Lamin A(LMNA) are induced by laminopathy-causing mutations, we investigated tertiary structures and dynamics of LMNA Ig-like domain by NMR by developing the “MagRO-FLYA-CYANA” system for fully-automated NMR assignment and structure determination. As a result, we determined the tertiary structures of 5 mutants of the LMNA Ig-like domain. These mutants cause different types of laminopathy.

研究分野：構造生命科学

キーワード：NMR

## 1. 研究開始当初の背景

ラミンは骨格タンパク質で、核膜の内側に局在し「核ラミナ」と呼ばれる網目状構造を形成して、核の構造形成に必須の役割を担う。また、細胞分裂、遺伝子の複製や発現の制御などにも不可欠な役割を担っており、細胞の形成上だけでなく生命機能の正常な発現と維持においても直接重要な働きをしている。

ラミンは、coiled-coil 配列を中心とした Rod domain と、C 末端の球状のドメイン(Tail 領域)からなる。主に Rod domain 間の相互作用により、ラミンは二量体を形成し、この二量体が次々と規則的に重合することで、線維状のラミンフィラメントを形成する。

核ラミナを形成するラミン A(LMNA)蛋白質をコードする遺伝子に変異が生じると、ラミノパシーと呼ばれる重篤な遺伝性疾患が引き起こされる。ラミノパシーには、プロジェリアなどの早老症、筋ジストロフィーなど、症状が重篤であるだけでなく有効な治療法が確立されていない疾患が多い。また、LMNA の変異がラミノパシーを引き起こす本質的なメカニズムは大部分が未解明である。

これまでに、ラミノパシーを引き起こす変異型 LMNA は数多く報告されている。とりわけ、約 400 アミノ酸残基からなる Rod domain 領域よりも、約 100 アミノ酸残基からなる C 末端の Tail 領域、その中でも特に Ig-like domain の部分に多くのラミノパシー原因変異が集中している。

また、興味深いことに、変異の位置によって、発症するラミノパシーの種類が異なることが報告されている(Krill et al. (2002) Structure)。このことから、特定の位置におけるアミノ酸置換によって惹起される LMNA タンパク質の物理化学的変化が、特定のラミノパシーの発症に密接に関連している可能性が高い。すなわち、ラミノパシー発症の本質的解明へ向けた観点からは、ラミノパシー原因変異が LMNA の構造や機能にどのように関与しているかの解明は重要である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、LMNA のどのような物理化学的変化がどのようなラミノパシーを引き起こすかについて、その法則性の分子基盤を解明することを目的として、変異型 LMNA タンパク質の局所的な構造変化や分子運動のダイナミクスの変化を、溶液 NMR 分光法や熱力学的分析法を用いて分子レベルで解明する。そしてその知見に基づいてラミノパシーを引き起こす LMNA の物性を明らかにすることで、ラミノパシー発症の本質的メカニズムを解明することを目標とする。

LMNA が担う機能は多岐に亘るため、動物や細胞などを用いた実験だけでは、変異型 LMNA が引き起こしている本質的現象を同定することは難しい。そこで、発症の直接の原因物質である LMNA 蛋白質そのものが、変異によってどのような影響を受けているのか、構造

生物学的解析によるアプローチが重要な知見をもたらすと期待される。

本研究課題は、変異型 LMNA Ig-like domain の立体構造を解明することに加えて、1) 変異によって正常型から変化した立体構造領域を、分子運動のダイナミクスの解析や熱力学的特性の測定によって明らかにすること、2) その解析をできるかぎり数多くの変異型 LMNA Ig like domain で行って、集積した構造生物学的知見からラミノパシー発症を引き起こす分子メカニズムの本質を見出すこと、を目標とする。立体構造解析に各種物理化学的分析法による解析を加えることで、その理解が深まると考えた。疾患原因蛋白質の立体構造の全体像を決定するだけにとどまらず、蛋白質の“動的な揺らぎ”を含めた解明を、しかも多数の変異体について網羅的に行うことで疾患発症の本質を探るという多角的な発想は、本研究の学術的な特色および独創的な点であり、また本研究の進展によってラミノパシーの病態の本質を分子レベルで解明できるだけでなく、その知見に基づいて変異型 LMNA を創薬のターゲットとした効果的な薬剤の設計・創製に直結する点も、本研究と今後の研究に現実的に期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 安定同位体で標識した野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の大量発現・精製法の確立

LMNA Ig-like domain 蛋白質を対象とした構造生命科学的解析を行うにあたり、目的蛋白質を高純度かつ大量に取得することがまず不可欠である。一般的な方法である大腸菌を宿主とした遺伝子組換え蛋白質発現系を用いて、野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の大量発現および精製法を確立する。

(2) 野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造決定

溶液 NMR 法を中心とする構造生命科学的な手法により、精製した野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造を高精度に決定し、両者を比較することで、ラミノパシー原因変異が LMNA Ig-like domain 蛋白質へ与えた構造上の変化を原子レベルで明らかにする。

(3) 野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の運動性のダイナミクスの解析と比較

溶液 NMR 法により、精製した野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の運動性の違いを高精度に調べることににより、ラミノパシー原因変異が LMNA Ig-like domain 蛋白質へ与えた構造上の変化を原子レベルで明らかにする。

(4) ラミノパシー変異による立体構造の変

化に伴う LMNA Ig-like domain 蛋白質分子内の物理化学的性質の変化の解析

変異型 LMNA Ig-like domain の熱安定性について、蛍光分光法や溶液 NMR 法などを用いて網羅的な測定を行い、変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造形成の自由エネルギーなどの熱力学的パラメータを定量的に解析することで、LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造形成の物理化学的基盤を解明する。

LMNA Ig-like domain に生じるラミノパシー変異の中には、細胞実験において特徴的なフェノタイプを示すものが報告されている (Mitsuhashi H et al. (2010) *J.Cell.Sci.*)。その一例として、Y481H, R453W, L530P などの変異が生じると、LMNA Ig-like domain の 458 番目のセリン残基 (S458) のリン酸化が亢進するという現象が起こる (Mitsuhashi H et al. (2010) *J.Cell.Sci.*)。また、S458 のリン酸化の亢進が起こった変異体は、同一のラミノパシーを発症する 경우가多く、S458 のリン酸化は特定のラミノパシーを引き起こす原因である可能性が高い (Mitsuhashi H et al. (2010) *J.Cell.Sci.*)。しかし、それら特定のラミノパシー変異が、どのようなメカニズムで S458 のリン酸化の亢進を引き起こすのか、その分子基盤は未だ明らかになっていない。本研究において野生型とラミノパシー変異型の LMNA Ig-like domain の立体構造および物理化学的性質の違いを詳細に比較することで、そのメカニズムの解明に繋がると期待される。

#### 4. 研究成果

(1) 安定同位体で標識した野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の大量発現・精製法の確立

大腸菌発現系を用いて、野生型および 9 種のラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の大量発現・精製法の確立に成功した。溶液 NMR 測定により物性の確認を行ったところ、そのうち野生型および 5 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質について、とても良質な NMR スペクトルが得られることが判明し、野生型およびそれらの変異体については多次元 NMR スペクトルの測定と立体構造決定が十分可能であることがわかった。

(2) 野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造決定

野生型および 5 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質について、多次元 NMR スペクトルの測定を行い、良質のスペクトルを得ることに成功した。そこで、本研究代表者と同じ研究室 (阪大たんぱく研 機能構造計測学研究室) の小林直宏 特任准教授が開発した自動 NMR 解析・立体構造決定プログラム

MagRO-FLYA-CYANA を用いて、野生型および 5 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の多次元 NMR スペクトルの解析と立体構造決定を試みた。その結果、現在までに、野生型および 4 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の立体構造の高精度決定に成功している。残り 1 種の変異体については、熱安定性が低く、多次元 NMR スペクトルの解析に難儀しているが、時間をかけて丁寧に解析することで十分構造解析可能であると考えており、引き続き解析を進めている。

(3) 野生型およびラミノパシー変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質の運動性のダイナミクスの解析と比較

野生型および 5 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質について、溶液 NMR 法である緩和測定 ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  NOE,  $R_2$  分散実験) を行い、現在解析を進めているが、野生型に比べて変異体で主鎖の運動性に違いがある部分徐徐に明らかになりつつある。

(4) ラミノパシー変異による立体構造の変化に伴う LMNA Ig-like domain 蛋白質分子内の物理化学的性質の変化の解析

野生型および 5 種の変異型 LMNA Ig-like domain 蛋白質について、その熱安定性の違いを、Real-time PCR を用いた Thermal shift assay により調べている。その結果、野生型に比べて各種変異体は有意に熱安定性が低いことを見出した。現在、熱安定性の違いと運動性の違いなどの相関を調べて、変異が LMNA Ig-like domain 蛋白質の構造形成にどのような影響を与えているかを引き続き解析を進めている。

#### 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 6 件)

1. Sugiki T, Takeuchi K, Shimada I, Takahashi H. Preparation of isotopically-labeled recombinant proteins by using yeast *Kluyveromyces lactis* expression system. *PSSJ Archives* **9**: e082 (2016) (査読あり)
2. Lin Y, Kardos J, Imai M, Ikenoue T, Kinoshita M, Sugiki T, Ishimori K, Goto Y, Lee YH. Amorphous Aggregation of Cytochrome c with Inherently Low Amyloidogenicity Is Characterized by the Metastability of Supersaturation and the Phase Diagram. *Langmuir* **32**: 2010-2022 (2016) (査読あり)
3. Kinoshita M, Kim JY, Kume S, Sakakibara Y, Sugiki T, Kojima C, Kurisu G, Ikegami T, Hase T, Kimata-Arigo Y, Lee YH. Physicochemical nature of interfaces controlling ferredoxin NADP(+)

reductase activity through its interprotein interactions with ferredoxin. *Biochim Biophys Acta* **1847**: 1200-1211 (2015) (査読あり)

4. Furuite K, Kataoka S, Sugiki T, Hattori Y, Kobayashi N, Ikegami T, Shiozaki K, Fujiwara T, Kojima C. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. *J Biomol NMR* **61**: 55-64 (2015) (査読あり)
5. Kosami K, Ohki I, Nagano M, Furuita K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, Kojima C. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *J Biol Chem* **289**: 28569-28578 (2014) (査読あり)
6. Sugiki T, Fujiwara T, Kojima C. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **9**: 1189-1204 (2014) (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 片岡沙織, 杉木俊彦, 古板恭子, 藤原敏道, 児嶋長次郎. 難発現蛋白質の安定同位体標識と大量発現を可能にする pCold-GST システムの技術開発. 第53回NMR討論会、2014.11.4-6、大阪
2. 高橋栄夫, 大浪真由美, 杉木俊彦, 坂倉正義, 竹内恒, 嶋田一夫. 高難度タンパク質の NMR 解析に向けた酵母発現系の活用. 第53回NMR討論会、2014.11.4-6、大阪
3. 片平律子, 古板恭子, 杉木俊彦, 李映昊, 服部良一, 木川隆則, 村上みどり, 藤原敏道, 児嶋長次郎. <sup>19</sup>F 含有化合物ライブラリを用いた創薬 NMR スクリーニング技術の開発. 第53回NMR討論会、2014.11.4-6、大阪
4. 杉木俊彦. 酵母発現系を用いた安定同位体標識試料の調製法. 第15回日本蛋白質科学会年会、2015.6.25、徳島
5. 杉木俊彦, 藤原敏道, 児嶋長次郎. Scrambling-free なアミノ酸選択的 <sup>13</sup>C 標識法と <sup>13</sup>C 標識の高選択性を利用したアミノ酸選択的 <sup>15</sup>N シグナル抽出法の開発. 第54回NMR討論会、2015.11.6-8、千葉
6. 三尾宗代, 角田舞, 山下隼人, 杉木俊彦, 三尾和弘. 核膜タンパク質 A 型ラミンの電子顕微鏡構造解析. *BMB2015*、2015.12.2、神戸
7. 杉木俊彦, Nesreen Alsanousi, 古板恭子, 藤原敏道, 児嶋長次郎. ヒト内在性神経保護ペプチド Humanin の立体構造および機能発現に関する NMR 解析 *BMB2015*、

2015.12.1、神戸

〔図書〕(計 2 件)

1. Sugiki T, Fujiwara T, Kojima C. Cold-Shock Expression System in *E. coli* for Protein NMR Studies. *Methods in Molecular Biology: Heterologous Gene Expression in E. coli*, 掲載決定済(査読あり)
2. Hanada K, Sugiki T. Characterization of Lipid Transfer Proteins, *Neuromethods: Lipidomics*, 掲載決定済(査読あり)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉木 俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)  
大阪大学・たんぱく質研究所・助教  
研究者番号：70635698

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：