

リン脂質を認識するタンパク質の脂質二重膜における配向に関する構造生物学的研究

●寺沢 宏明

東京大学大学院薬学系研究科

＜研究の目的と進め方＞

- ・ **目的**：シグナル伝達タンパク質の中には、受容体と相互作用すると同時に、細胞膜とも直接結合するものが存在する。また、エンドサイトーシスなど、種々の小胞形成において、細胞膜上でのタンパク質複合体の形成が重要な役割を果たす。このようなタンパク質には、ある特定の脂質を認識して結合するドメインが含まれており、近年イノシトールリン脂質に結合することが明らかになったPXドメインもその1つである。PXドメインをはじめとする、脂質を認識するタンパク質が、脂質二重膜と結合する際、どのようなステップで、どのように相互作用するかの詳細については、未だよくわかっていない。PXドメインについては、単にリン脂質の極性の高い部位を認識するだけでなく、PXドメインのループ部分によって膜の疎水性の高い領域を認識することが示唆されている。しかし、これらの考察はミセルを用いた実験結果によるものであり、脂質二重膜とPXドメインの相互作用を解析することが必要と考えた。本研究では、当研究室において開発した転移交差飽和法 (J. Mol. Biol., 2002, 318, 245-249; Nature Struct. Biol., 2003, 10, 53-58) を用いて、1) PXドメインの脂質二重膜の認識機構の解明、および、得られた結果に基づき、2) タンパク質と脂質二重膜の相互作用を解析する方法論の開拓を目指す。
- ・ **進め方**：PXドメイン・脂質二重膜系における転移交差飽和法のNMR測定条件を検討する。具体的には、脂質二重膜の調製法や成分比、脂質二重膜-タンパク質の量比、結合・解離定数などについて検討を行う。さらに、他の脂質認識タンパク質について、本手法の適用を検討する。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) NMRによる脂質二重膜-タンパク質相互作用解析法の開発を行う。
- 2) 安定同位体標識p47 PXドメインの大量取得を行う。
- 3) NMRによる脂質二重膜におけるタンパク質の膜内配向と構造変化の同定

＜研究期間の成果＞

- 1) p47 PXドメインの発現・精製系を確立して安定同位体標識タンパク質を取得し、三重共鳴NMRの測定とアミノ酸選択的標識による主鎖連鎖帰属を終了した。
- 2) p47 PXドメインにおけるPI(3,4)P2含有リポソームとの相互作用部位を転移交差飽和法に基づいて同定した。明らかになった相互作用部位は、変異体と表面プラズモン法のみを用いたWilliams RLらのグループの結果とは全く異なった部位であった。さらに、Williamsらはホスファチジン酸結合部位を示しているが、我々の結果では、ホスファチジン酸の結合はPI(3,4)P2に比較して非常に弱く、PI(3,4)P2存在下ではp47 PXドメインとは相互作用しない。
- 3) 他のPXドメインにおいて、detergentを用いた結合実験

によって示されたmembrane insertion loopは、p47 PXドメインにおいてはリポソームとの相互作用が観測されなかった。

＜国内外での成果の位置づけ＞

転移交差飽和法の開発によって、ミセルに比較して飛躍的に分子量が大きくかつ広い分子量分布を持つ脂質二重膜とタンパク質との相互作用解析がはじめて可能となった。完全にサイズの均一な脂質二重膜を調製することは困難であり、転移交差飽和法の特長を生かした本研究は、他の構造生物学的手法に類を見ない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

- ・ 達成出来なかったことについて、該当無し。
- ・ 予想外の困難として、タンパク質とリポソームを混合した際に、多くの沈殿が生じたことが挙げられる。リポソーム中のイノシトールリン脂質と他の脂質との比率を検討することにより、顕著な改善が見られた。

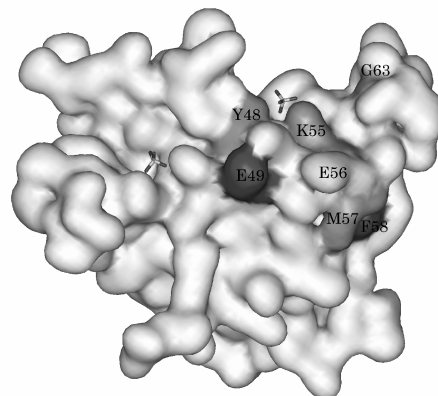
＜今後の課題＞

- ・ p47 PXドメイン・リポソーム系について、引き続き検討を進めて精度を高めるとともに、p47 PXドメイン上の脂質二重膜との相互作用に重要なアミノ酸残基に変異を導入し、変異体のin vitroまたはin vivoの機能解析により、得られた結果の検証を行う。
- ・ p47 PXドメイン以外の脂質認識タンパク質に対して本手法の適用を試みる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 1) N.Nishida, M.Sumikawa, M.Sakakura, N.Shimba, H.Takahashi, H.Terasawa, E.Suzuki, and I.Shimada, Nat.Struct.Biol., 10, 53 (2003).(0310291358)

RI > 0.3
0.25 < RI < 0.3
0.2 < RI < 0.25



(図) 転移交差飽和法に基づいて決定したp47 PXドメインにおけるPI(3,4)P2含有リポソームとの相互作用部位。RIは、飽和移動によるシグナル減衰率を示す。赤、オレンジ、黄色の順に強く飽和を受けたことを示す。

- 2) M.Takeda, H.Terasawa, M.Sakakura, Y.Yamagushi,
M.Kajiwara, H.Kawashima, M.Miyasaka, and I.Shimada,
J.Biol.Chem., 278, 43550 (2003) (310291426)
- 3) M.Takeda, H.Terasawa, M.Sakakura, Y.Yamagushi,
M.Kajiwara, H.Kawashima, M.Miyasaka, and I.Shimada,
J.Biomol.NMR, 29, 97 (2004) (310291431)