

実施課題名: GPCR・モジュレーター特異的複合体の構造:単独で特定の構造を形成しないペプチドのペアを用いた解析

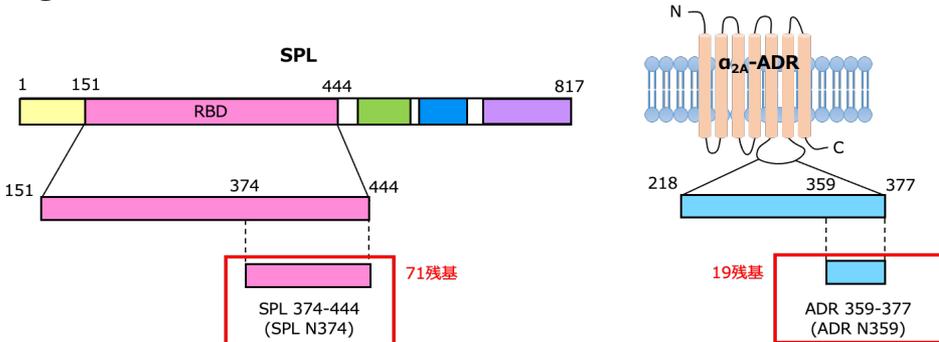
【背景】

凝集しやすいタンパク質とそのターゲットとの複合体構造を詳細に解析する方法の開発を目的としている。今回は、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体($\alpha 2A$ -ADR)とそのモジュレーターであるスピノフィリン(SPL)について、それぞれの相互作用部位に相当するペプチド(ADR N359, 凝集しやすい。およびSPL N374, Fig. 1)どうしが形成する複合体の立体構造を決定しその相互作用様式を解明することを最終目標としている。SPL N374は71残基中にGluを19残基, Aspを10残基含み, 我々の500 MHz(室温probe)ではシグナル帰属に必要な測定ができなかった。そこで理化学研究所の装置を利用しシグナル帰属を試みた。

【実施内容】

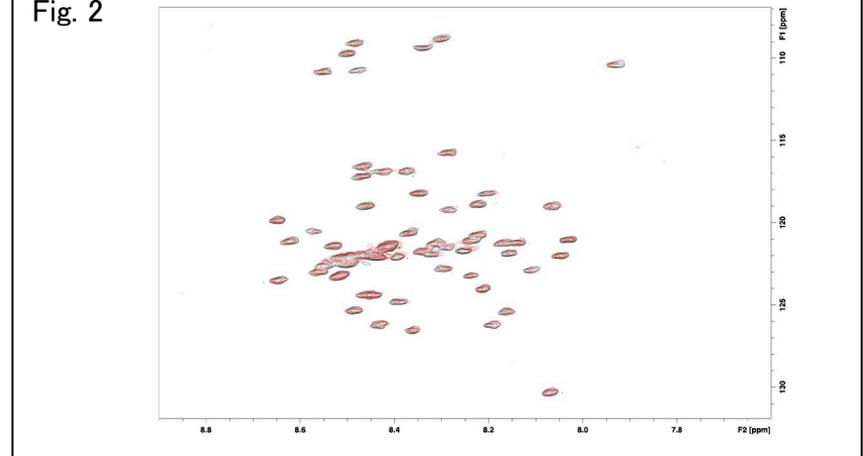
- HNC0, HNCAC0, HNCA, HNCOC0, HNCACB, CBCACONH, HBHACONHの測定により, SPL N359のほぼ全て(Pro以外)の主鎖とC β のシグナルを帰属することができた。
- 相互作用することが別の実験から予測されていたSPL N374の残基XaaのNHシグナルがADR N359の添加で移動した。他のシグナルも含め, 1:1 (mol/mol) で移動は飽和した(Fig. 2)。
- SPLのXaaをAlaに置換したアナログではADR N359との結合が弱くなり, ADR側の結合残基YaaのHSQCシグナルも移動しなくなった。
- ADR N359は19残基と短いにもかかわらず, SPL N374の広範囲のアミドシグナルが, ADR N359の添加で移動した。SPL N374分子内に元々存在する一過的な水素結合がADR N359との結合で切断され, 新たな水素結合が形成されることがその原因であることがアミドプロトンの化学シフト温度依存性から示唆された。

Fig. 1



SPL N374とADR N359の存在部位

Fig. 2



SPL N374の 1H - ^{15}N HSQCスペクトル: 黒(-ADR), 赤(+ADR)

NMR 共用プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-052		
利用課題名	GPCR・モジュレーター特異的複合体の構造:単独で特定の構造を形成しないペプチドのペアを用いた解析		
所属機関	群馬大学		
所属部署	大学院 理工学府 分子科学部門		
役職・氏名	役職	教授	氏名 若松 馨
利用実施時期、及び期間	2022年10月21日～2022年10月25日 総利用日数: 4日 <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

1. 本課題の概要・目的

凝集しやすいタンパク質とそのターゲットとの複合体構造を詳細に解析する方法の開発を目的としている。GPCRの細胞内ループはGタンパク質やモジュレーターと相互作用するが、アミロイド化傾向の高いアミノ酸配列を有するループは凝集しやすく解析が困難である。今回は、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体($\alpha 2A$ -ADR, 血圧調節に関与する)とそのモジュレーターであるスピノフィリン(SPL, 欠損は異常な血圧低下をもたらす)について、それぞれの相互作用部位に相当するペプチドどうしが形成する複合体の立体構造を決定し、その相互作用様式を解明することを最終目標としている。 $\alpha 2A$ -ADRの細胞内第三ループとSPLの受容体結合ドメインは相互作用することが知られているが、具体的な残基や複合体の構造などは不明であった。我々は前者を19残基(ADR N359)、後者を71残基(SPL N374)のペプチドにまで絞り込んだ。

ADR N359, SPL N374ともに分離が比較的良好な $1H$ - $15N$ HSQCスペクトルを与えた。しかし、SPL N374は71残基中にGluを19残基、Aspを10残基含み、 $C\beta$ の分離も悪いので、我々のNMR装置(500 MHz, 室温 probe)ではシグナル帰属に必要な分離・感度の良い測定はできなかった。理化学研究所の装置を利用すれば、シグナル帰属に必要な測定ができると期待した。

2. 成果の概要

実施内容

- (1) $1H$ - $15N$ HSQC, $1H$ - $13C$ HSQC, HNC0, HNCACO, HNCA, HNCOCA, HNCACB, CBCACONH, HBHACONHの測定により、SPL N359のほぼ全て(Pro以外)の主鎖と $C\beta$ のシグナルを帰属することができた。
- (2) SPLのCys-431残基はADR N359のTrp-362と相互作用することが蛍光測定などから予想されていた。SPLのCys-431のNHシグナルがADR N359との相互作用で移動することが帰属の確定により確認できた。
- (3) ADR N359は19残基と短いにもかかわらず、ADR N359との結合がSPL N374の広範囲のNHシグナルの移動を引き起こす原因は従来不明であった。水素結合形成を反映するアミドプロトンの化学シフト温度依存性を複合体形成前後で比較することにより、SPLのD391-I434(44残基)という広範囲に渡って水素結合の切断・形

成が ADR N359 との複合体形成により引き起こされることが明らかとなった。このことは SPL N374 分子内に元々存在する一過的な水素結合が ADR N359 との結合で切断されること、新たな水素結合が形成されることを示唆しており、広範囲なシグナル移動の原因を説明できると考えられる。

(4) SPL の Cys431 を Ala に置換した変異体は ADR N359 との結合が弱くなることが 15N ラベルした ADR-N359 の 1H-15N HSQC 測定により確認された。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

SPL N374 の主鎖シグナルの帰属は 500 MHz/室温 probe の装置では困難であったが、理研の装置を利用することで可能になり、目標の 1 つを達成できた。主鎖シグナルの帰属が確定したことにより、SPL の Cys431 が ADR との結合に関与していることが確認できた。更に、「SPL N374 のアミドプロトンの化学シフトの温度依存性」と「ADR N359 との結合に伴う SPL N374 の構造変化」を部位特異的に議論できたのは大きな進歩である。一方、アミロイド的凝集をしやすい ADR N359 の凝集を C 末端への Gly 残基の延長で防止しようとする試みは、残念ながら成功しなかった(むしろ、凝集が促進されてしまった)。そこで、「凝集性の低い ADR N359 アナログと SPL N374 との複合体の NMR 測定(シグナル帰属、構造決定、運動性解析)」には残念ながら取りかかれなかった。

成果発表

群馬大学の修士論文の審査発表会で成果を発表したが、学外にはまだ発表していない。

今後の展開

ADR N359 のアミロイド的自己凝集と SPL N374 との複合体形成は競合する、つまり、ADR N359 のアミロイド的自己凝集は SPL N374 との複合体形成で抑制できる事が別の実験で分かった。サンプルの調製手順を最適化すれば、SPL N374 と ADR N359 との複合体の NMR 解析が可能になると期待される。またこのアプローチは凝集しやすいタンパク質・ペプチドの NMR 解析に広く応用できる可能性がある。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

アミロイド的凝集は種々の疾患の原因となっており、その複合体の構造解析は疾患の発症機構の解明、治療薬の開発などに役立つと期待される。SPL N374・ADR N359 複合体のサンプル調製手順の最適化アプローチは医療の発展や国民の健康に寄与する可能性がある。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

理研の担当者にはお忙しいなか、柔軟に対応していただきました。とても感謝しております。

また、一緒に操作することにより、測定パラメータの最適化手順がよく分かり、今後の NMR 測定の参考になりました。この点についてもお礼申し上げます。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

液体ヘリウムの高騰により、個々の大学で NMR を維持するのが困難になっています。NMR 共用プラットフォーム(高性能でメンテナンスも行き届いた装置、経験豊富な担当者)は NMR 研究者にとって心強い存在です。長期間にわたって維持されることを切に望みます。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 700MHz

利用期間 1: 2022 年 10 月 21 日～2022 年 10 月 25 日

9. その他の利用施設

群馬大学

溶液 500MHz