

博士論文審査報告書

論文題目：脂質二重膜表面において誘起される pleckstrin homology domain の立体構造変化の解析

申請者：徳田尚美

1. 論文内容の要旨

細胞内情報伝達系等、重要な細胞機能に関わる蛋白質の多くは、細胞質から生体膜表面に局在し、脂質二重膜表面に結合した状態で機能を発揮する。通常、このような蛋白質の機能は、X線回折法および溶液 NMR 分光法によって得られる結晶中および水溶液中の蛋白質構造に基づいて解析されている。しかし、脂質二重膜表面の環境が水溶液中とは大きく異なる点を考慮すると、生体膜表面における蛋白質の機能は、脂質二重膜表面環境下における蛋白質の構造に基づいて理解する必要があると考えられる。本研究では、分光学的手法（固体 NMR、CD および蛍光分光法）を用い、蛋白質の生体膜結合を制御するドメインである pleckstrin homology (PH) ドメインを対象として、脂質二重膜表面において誘起される高次構造の解析を行い、その特徴と機能との関連について新たな知見を得た。

本論文では、細胞内情報伝達、細胞骨格制御等に関わる蛋白質である SWAP-70 および Def6 に関して、これらの蛋白質の細胞膜への結合を支配するドメインである PH ドメインを単離し、水溶液中および脂質二重膜ベシクルに結合した際の構造を分光学的に解析した。SWAP-70 PH ドメインの CD、蛍光および ^{13}C NMR スペクトルより、結合基質であるイノシトールリン脂質、 $\text{PtdIns}(3, 4, 5)\text{P}_3$ および $\text{PtdIns}(4, 5)\text{P}_2$ の極性頭部への結合を介して脂質二重膜表面に局在したときに、SWAP-70 PH ドメインの二次構造が変化することが見いだされた。一方、イノシトールリン脂質結合サイトへの水溶性結合基質アナログ ($\text{Ins}(1, 3, 4, 5)\text{P}_4$) の結合は、構造変化を誘起しなかった。また、 $\text{PtdIns}(3, 4, 5)\text{P}_3$ および $\text{PtdIns}(4, 5)\text{P}_2$ の極性頭部の構造の違いは、脂質二重膜上で誘起される二次構造に影響を与えなかった。これらのことから、PH ドメインが脂質二重膜上にアンカーされることで、脂質二重膜表面との相互作用を介して高次構造変化が誘起されることが明らかになった。また、CD および固体 ^{13}C NMR スペクトルは、SWAP-70 PH ドメインの C 末端部位に位置する α -ヘリックス構造が脂質二重膜への結合により、ランダムコイルへ転移することを明らかにした。この α -ヘリックス中には核移行シグナル配列 (NLS) が含まれていることから、ここで見いだされた二次構造変化が、NLS の露出を制御し、細胞中で見いだされている細胞膜から細胞核への SWAP-70 の移行の制御に関与している可能性が示唆される。Def6 PH ドメインは、SWAP-70 PH ドメインと一次構造の相同性が高く、水溶液中における高次構造は SWAP-70 PH ドメインと類似している。CD および ^{13}C NMR スペクトルは、Def6 PH ドメインが $\text{PtdIns}(3, 4, 5)\text{P}_3$ への

結合を介して脂質二重膜上に局在したときに、脂質二重膜との相互作用によりドメイン全体の二次構造が変化することを示した。しかし、構造変化の特徴は SWAP-70 PH ドメインと異なっており、 α -ヘリックス-ランダムコイル間の構造転移は Def6 PH ドメインでは生じないことが見いだされた。このことから、水溶液中において類似の構造を持つ PH ドメインが脂質二重膜表面において異なる高次構造をとりうるということが明らかになった。これらの結果は、生体膜表面における蛋白質機能を理解するための基盤として脂質二重膜表面において誘起される立体構造を明らかにすることの重要性を示した。また、脂質二重膜表面における構造を解析するための手法として、分光学的方法が有効であることを示している。

2. 論文審査結果

本論文は、イノシトールリン脂質を介して脂質二重膜表面に結合した pleckstrin homology domain (PH ドメイン) の構造を固体 ^{13}C NMR、CD および蛍光分光法を用いて解析することで、脂質二重膜表面環境において水溶液中とは異なる構造が誘起されることを新たに見だし、生体膜表面における蛋白質の機能の理解に脂質二重膜表面における構造の解析が重要であることを示している。細胞内情報伝達系に含まれる SWAP-70 の PH ドメインについて、結合基質となるイノシトールリン脂質への特異的結合を介して脂質二重膜表面に結合したときに生じる大きな二次構造変化を明らかにし、構造変化に含まれる α -ヘリックス-ランダムコイル転移が核移行シグナル配列の構造変化を通して SWAP-70 の細胞内局在の制御に関わる可能性を示した。また、水溶液中で類似の構造を持つ SWAP-70 PH ドメインおよび Def6 PH ドメインについて、脂質二重膜表面で誘起される高次構造の特徴が大きく異なることを明らかにした。これらのことは、脂質二重膜に結合した PH ドメインを対象として各種の分光学的手法による解析を行うことで得られた新規の知見であり、PH ドメインの性質について新たな見方を与えている。また、生体膜上に局在する蛋白質の機能の理解に、脂質二重膜表面で誘起される高次構造の情報が必要である事を示す点で重要であり、膜表面環境を対象とする分光学的方法による解析が細胞の生理的機能の理解に有効であることを示している。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 24 年 1 月 20 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査： 小倉尚志 印

副査： 大隅 隆 印

： 樋口芳樹 印

： 内藤 晶 印

(横浜国立大学大学院工学研究院、教授)

： 辻 暁 印