

Title	PIP2結合タンパク質による脂質膜中のPIP2認識の構造基盤
Sub Title	Structural basis for PIP2 recognition, embedded in membranes, by PIP2-binding proteins
Author	横川, 真梨子(Yokogawa, Mariko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>イノシトール (4, 5) 2リン酸 (PIP2) は生体膜に存在し、様々なタンパク質と結合することでシグナル伝達や細胞の形態形成などの生理機能を担う。したがって、PIP2結合タンパク質がどのようにして細胞膜中のPIP2を認識するのかを解明することは、生命現象の理解につながる。そこで本研究では、ビンキュリンのtailドメイン (Vt) とPLCδ1のPHドメイン (PLCδ1 PH) を実施例として、PIP2含有リポソームとの相互作用を定量的に調べた。その結果、VtとPLCδ1 PHではPIP2との結合様式が異なり、Vtは細胞膜中のPIP2の割合を上げると結合率が急激に上昇したことから、PIP2認識に正の協同性があることが分かった。そこで、このVtの協同的PIP2認識様式の構造基盤を得るため、NMR法によるVtとPIP2含有ナノディスクの相互作用解析を行った。</p> <p>まず、VtのNMRシグナルの帰属を行った。Vtの分子内に12個存在するIle残基を1個ずつ別の残基に置換した変異体を調製し、Ileのメチル基を選択的に¹H, ¹³Cで、それ以外を²H, ¹²Cで標識したVtのNMR測定を行うことにより、各シグナルを帰属した。Vtに対してPIP2を含まないナノディスクを添加した場合にはスペクトル変化がほとんど観測されなかったが、PIP2含有ナノディスクを添加した場合にはサンプルが白濁し、一部のシグナルに広幅化や化学シフト変化が観測された。以上より、VtがPIP2と相互作用し、一部は沈殿したことが分かった。ナノディスク中のPIP2濃度を1%または4%として行った実験結果を比較すると、1%の場合にはナノディスク添加量の増加に伴うシグナル特異的な広幅化が確認されたが、4%の場合には0.25当量のナノディスク添加時点で多くのシグナルが消失し、残基特異的な解析は困難であった。1%PIP2含有ナノディスクとの相互作用により影響を受けたIleは、I919、I920、I954、I988であり、これらの残基がナノディスク中のPIP2との相互作用に関与していることが示唆された。</p> <p>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) is a component of biological membranes and is responsible for physiological functions such as signal transduction and cell morphogenesis by binding to various PIP2-binding proteins. Therefore, elucidating how each PIP2-binding protein recognizes PIP2 within membranes leads to better understanding of PIP2-related physiological events. In this study, we prepared a tail domain of vinculin (Vt) and a PH domain of PLCδ1 (PLCδ1 PH) and quantitatively analyzed the interaction between each protein and PIP2-containing liposomes, indicating that Vt binds to PIP2 in liposomes with positive cooperativity. To gain structural basis for the cooperative PIP2-binding mode of Vt, we performed NMR analyses of the interaction between Vt and PIP2-containing nanodisc, a membrane mimetic suitable for NMR. To use Ile-delta1 methyl groups of Vt as a probe to determine PIP2 binding site on Vt, each of twelve Ile residues of Vt was mutated to another residue and their assignments were confirmed based on their NMR spectra. When nanodiscs without PIP2 were mixed with Vt, Ile signals of Vt were not perturbed. On the other hand, several signals were perturbed upon addition of PIP2-containing nanodiscs and the sample become cloudy, indicative of precipitation. Thus, it was confirmed that Vt bound to PIP2 in nanodiscs, and precipitated in part. When using nanodiscs containing PIP2 with a ratio of 4%, most of the signals disappeared upon addition of 0.25 molar equivalent of nanodiscs to Vt, therefore residue-specific changes were not observed. On the other hand, upon addition of nanodiscs containing PIP2 with a ratio of 1%, intensity reduction of the Ile methyl signals was specifically observed for I919, I920, I954, and I988, suggesting that these Ile residues were involved in the interaction with PIP2 in nanodiscs.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220127

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	500（特B）千円
	氏名	横川 真梨子	氏名（英語）	Mariko Yokogawa		
研究課題（日本語）						
PIP2 結合タンパク質による脂質膜中の PIP2 認識の構造基盤						
研究課題（英訳）						
Structural basis for PIP2 recognition, embedded in membranes, by PIP2-binding proteins						
1. 研究成果実績の概要						
<p>イノシトール(4,5)2リン酸(PIP2)は生体膜に存在し、様々なタンパク質と結合することでシグナル伝達や細胞の形態形成などの生理機能を担う。したがって、PIP2 結合タンパク質がどのようにして細胞膜中の PIP2 を認識するのかを解明することは、生命現象の理解につながる。そこで本研究では、ビンキュリンの tail ドメイン(Vt)と PLC δ 1 の PH ドメイン(PLC δ 1 PH)を実施例として、PIP2 含有リポソームとの相互作用を定量的に調べた。その結果、Vt と PLC δ 1 PH では PIP2 との結合様式が異なり、Vt は細胞膜中の PIP2 の割合を上げると結合率が急激に上昇したことから、PIP2 認識に正の協同性があることが分かった。そこで、この Vt の協同的 PIP2 認識様式の構造基盤を得るため、NMR 法による Vt と PIP2 含有ナノディスクの相互作用解析を行った。</p> <p>まず、Vt の NMR シグナルの帰属を行った。Vt の分子内に 12 個存在する Ile 残基を 1 個ずつ別の残基に置換した変異体を調製し、Ile のメチル基を選択的に ^1H, ^{13}C で、それ以外を ^2H, ^{12}C で標識した Vt の NMR 測定を行うことにより、各シグナルを帰属した。Vt に対して PIP2 を含まないナノディスクを添加した場合にはスペクトル変化がほとんど観測されなかったが、PIP2 含有ナノディスクを添加した場合にはサンプルが白濁し、一部のシグナルに広幅化や化学シフト変化が観測された。以上より、Vt が PIP2 と相互作用し、一部は沈殿したことが分かった。ナノディスク中の PIP2 濃度を 1%または 4%として行った実験結果を比較すると、1%の場合にはナノディスク添加量の増加に伴うシグナル特異的な広幅化が確認されたが、4%の場合には 0.25 当量のナノディスク添加時点で多くのシグナルが消失し、残基特異的な解析は困難であった。1%PIP2 含有ナノディスクとの相互作用により影響を受けた Ile は、I919、I920、I954、I988 であり、これらの残基がナノディスク中の PIP2 との相互作用に関与していることが示唆された。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) is a component of biological membranes and is responsible for physiological functions such as signal transduction and cell morphogenesis by binding to various PIP2-binding proteins. Therefore, elucidating how each PIP2-binding protein recognizes PIP2 within membranes leads to better understanding of PIP2-related physiological events. In this study, we prepared a tail domain of vinculin (Vt) and a PH domain of PLC δ 1 (PLC δ 1 PH) and quantitatively analyzed the interaction between each protein and PIP2-containing liposomes, indicating that Vt binds to PIP2 in liposomes with positive cooperativity. To gain structural basis for the cooperative PIP2-binding mode of Vt, we performed NMR analyses of the interaction between Vt and PIP2-containing nanodisc, a membrane mimetic suitable for NMR.</p> <p>To use Ile-δ1 methyl groups of Vt as a probe to determine PIP2 binding site on Vt, each of twelve Ile residues of Vt was mutated to another residue and their assignments were confirmed based on their NMR spectra. When nanodiscs without PIP2 were mixed with Vt, Ile signals of Vt were not perturbed. On the other hand, several signals were perturbed upon addition of PIP2-containing nanodiscs and the sample become cloudy, indicative of precipitation. Thus, it was confirmed that Vt bound to PIP2 in nanodiscs, and precipitated in part. When using nanodiscs containing PIP2 with a ratio of 4%, most of the signals disappeared upon addition of 0.25 molar equivalent of nanodiscs to Vt, therefore residue-specific changes were not observed. On the other hand, upon addition of nanodiscs containing PIP2 with a ratio of 1%, intensity reduction of the Ile methyl signals was specifically observed for I919, I920, I954, and I988, suggesting that these Ile residues were involved in the interaction with PIP2 in nanodiscs.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			