



Title	NMR study of structure-activity relationship of the biologically active peptide Humanin and the membrane binding protein CERT
Author(s)	Alsanousi Mohammed, Nesreen Ibrahim
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59519
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Nesreen Ibrahim Alsanousi Mohammed)

Title	NMR study of structure-activity relationship of the biologically active peptide Humanin and the membrane binding protein CERT (生物活性ペプチド・ヒューマニンと膜結合タンパク質CERTの構造活性相関に関するNMRによる研究)
-------	--

Abstract of Thesis

Humanin, a bioactive peptide consisting of 24 amino acid residues, was isolated from brain tissues of patients of Alzheimer's diseases. It have been reported that Humanin significantly suppresses various aging-related cell death that caused by amyloid fibrils aggregates and oxidative stress. Previous literature suggested that the cytoprotective activity of humanin peptide remarkably enhanced by optical isomerization of the Ser14 residue from L- to D-form as post-translational modification. As a result, Humanin D-Ser14 variant can significantly inhibit cell death with extremely low concentration, and thereby it is considered that Humanin is promising molecules in an effort to develop new drugs against aging-related cell degenerative diseases such as AD. However, molecular mechanisms of enhancement of the cytoprotective activity of Humanin caused by D-isomerization of the specific serine residue are remains unclear.

In this study, we demonstrated that Humanin D-Ser14 exhibited potent inhibitory activity against fibrillation of amyloid- β and remarkably higher binding affinity for amyloid- β than that of the Humanin wild-type and S14G mutant. In addition, we determined the solution structure of Humanin D-Ser14 by nuclear magnetic resonance (NMR) and showed that D-isomerization of the Ser14 residue enables drastic conformational rearrangement of Humanin. Furthermore, we identified an amyloid- β -binding site on Humanin D-Ser14 at atomic resolution by NMR. These biophysical and high-resolution structural analyses clearly revealed structure-function relationships of Humanin and explained the driving force of the drastic conformational change

and molecular basis of the potent anti-amyloid- β fibrillation activity of Humanin caused by D-isomerization of the Ser14 residue. This work has shown the correlations between the functional activity, tertiary structure, and partner recognition mode of Humanin and may lead to elucidation of the molecular mechanisms of the cytoprotective activity of Humanin.

In addition, it is considered that interaction between amyloid-beta, Humanin, and zinc ion has an important consequence for pathogenesis or development of AD. However, detail of the zinc ion recognition mode of the Humanin has not been clarified. We identified zinc ion binding site on the Humanin with atomic resolution.

Ceramide transfer protein (CERT) mediates ER-to Golgi trafficking of ceramide. CERT consists of two main functional domains, the plecksterin homology domain (PH), which serves to target the Golgi apparatus, and the START domain, capable of catalyzing inter-membrane transfer of ceramide. CERT-PH specifically binds phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P). In this work PI4P incorporated phospholipid bilayer nanodisc were used to assess the PH-domain-PI4P interaction using solution NMR techniques.

We identified a CERT PH biding site on the phospholipid bilayer by NMR. The NMR study revealed a nonspecific electrostatic interaction between the basic amino acids on the CERT PH and the lipids head groups and this derives the CERT PH domain to PI4P recognition and localization to the membrane. Iisothermal titration calorimetry (ITC) were used to gain insights into the thermodynamic signatures of the interaction, the result reveals that CERT PH domain binds to PI4P containing membranes with a high affinity. This binding mode reflects the function of PH domain of CERT.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Nesreen Ibrahim Alsanousi Mohammed)

論文審査担当者	(職)	氏 名
主査	教 授	藤原 敏道
副査	教 授	後藤 祐児
副査	教 授	栗栖 源嗣

論文審査の結果の要旨

細胞死抑制機能を持つヒューマニン・ペプチドの機能と溶液構造の相関、およびナノディスクを用いて脂質種に依存した脂質二重膜とセラミド輸送蛋白質の相互作用を、主に溶液 NMR 法を用いて研究された。

24 残基のペプチドであるヒューマニンの構造解析では、14 番目のセリン残基が L 体から D 体へ光学異性化した変異体では、その活性が顕著に増大することに注目した。このヒューマニン存在下でアルツハイマー病に関連するアミロイド β の β シート構造形成に伴う纖維化が抑制されることを、円偏光二色性と電子顕微鏡により確認した。活性の高い L-Ser14D-Ser 変異体構造を溶液 NMR 法で新たに決定して、天然型および S14G 変異体ヒューマニンとその立体構造を比較した。また、L-Ser14D-Ser 変異体ヒューマニンのアミロイド β との相互作用部位を、各原子スピンに帰属した NMR 信号強度の変化から求めた。これらにより、D-Ser 変異体では α ヘリックス構造が変異部位で曲がることにより疎水性残基が露出して、ペプチドとアミロイド β の分子間相互作用が促進すると考えられた。これらは、溶液状態で原子分解能構造決定と弱い相互作用測定ができる NMR 法の特徴を十分に利用して行われたものであり、他の方法では解析が困難であると考えられる。このような知見は、今後医療への応用にも寄与するだろう。

論文後半では、セラミドのゴルジ体への輸送に関連する蛋白質 Ceramide Transfer Protein が持つ機能の構造的基盤を明らかにするため、その PH ドメインと脂質膜に含まれる PI4P の相互作用を等熱滴定熱量計と NMR で解析された。分解能が高い溶液 NMR 等で定量的に解析するために脂質組成やサイズが均一な脂質二重層からなるナノディスクを作成した。この解析の結果、相互作用する分子数比、結合定数を明らかにした。また、蛋白質のトリプトファンなど疎水的残基と正電荷を持つ塩基性残基が PI4P を含む二重膜の界面と特異的に結合することを解明した。これにより蛋白質がどのようにコルジ体の脂質膜を認識して選択的に結合するのかを理解できるようになった。この解析では、ナノディスク試料をその足場蛋白質も含めて調製できたことが重要であった。

これら研究では、揺らぎの大きい溶液状態で、特定の脂質組成を持つ二重膜やアミロイド β 複合体という大きな対象との相互作用を、原子分解能で定量的に明らかにされた。これらは、試料調製も含めた最先端の NMR 分光法を活用して生物科学の重要な課題に取り組んだ成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。