

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07013

研究課題名(和文) アミノ酸配列と脂質の組み合わせが膜貫通ヘリックス構造・会合に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effects of amino acid sequence and lipids on the structure and self-association of transmembrane helices

研究代表者

矢野 義明 (Yano, Yoshiaki)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60402799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂質による膜タンパク質制御原理の一端の解明を目指し、会合モチーフGXXXGの周辺配列とコレステロールがヘリックス会合に与える影響を調査した。これらの組み合わせは会合力に大きく影響し、配向角測定と会合予測プログラムを用いて、コレステロール含有膜中で安定化される会合体は大きなヘリックス交差角を持つことが明らかになった。コレステロール含有膜が膜疎水部で持つ高い側方圧を解消するようにX字型の会合体構造が安定化しうると解釈でき、膜由来の力が膜タンパク質構造を制御する重要なメカニズムを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、膜貫通ヘリックスのアミノ酸配列に着目した研究、二分子膜の脂質組成に着目した研究はそれぞれ行われてきたが、生理的状态を考えると当然研究すべきにもかかわらず、両者の影響を系統的に測定し統合的に解釈するアプローチは皆無だった。本研究では定量性や一般性に優れ、膜内のヘリックス安定性、自己会合力を熱力学量や速度定数として計測できるモデル実験系を活用し、膜貫通ヘリックスの会合・構造のアミノ酸配列・コレステロール依存性のルールを解明した。これまで測定法の欠如、重要性の認知度不足などから無視されることも多かった、脂質による膜タンパク質制御メカニズムの一端を解明できた。

研究成果の概要(英文)：Effects of sequence context around GXXXG and membrane cholesterol on the self-association of helices were investigated to reveal lipid regulation mechanisms of membrane protein functions. The strength of helix association was very sensitive to the lipid composition. Measurements of helix orientation angle and computer prediction of the dimer structure revealed that membrane cholesterol selectively stabilize X-shaped helix dimers. These results demonstrate the significance of membranous force that constraint structure of membrane proteins.

研究分野：生体膜の生物物理化学

キーワード：モデル膜貫通ヘリックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PCR やサイトカイン受容体など重要な創薬標的分子の多くは、基本骨格として膜貫通ヘリックス構造を持つヘリカルな膜タンパク質であり、膜貫通ヘリックス間相互作用やヘリックスの構造変化は、生体膜環境である脂質二分子膜内でのタンパク質構造を決定する主要因だと考えられる。また「溶媒」に相当する脂質は多種多様であり膜厚や側方圧などの膜物性を変化させるため、膜タンパク質構造形成原理を解明するには、アミノ酸配列のみならず、脂質の影響の考慮も不可欠である。モデル膜への再構成実験から、多くの膜タンパク質の活性が膜物性に強く依存して変わりうる事は良く知られているが、細胞においても形質膜と小胞体膜ではコレステロール含量が異なるなどオルガネラ間で脂質組成が大きく変化する事から、オルガネラ依存的に膜タンパク質の構造・機能が制御されている可能性がある[Cell 142, 158 (2010)]。しかしその生理的重要性にも関わらず、アミノ酸配列と膜物性のどのような組み合わせが構造調節機構となりうるのかは殆ど不明である。脂質二分子膜内でのヘリックス間相互作用に関わるヘリックス由来、脂質由来の分子間力を系統的に解明するには、膜貫通ヘリックスを形成するモデルペプチドを用いてヘリックス会合の駆動力を計測するアプローチが有効であるが、これまでに膜貫通ヘリックスの自己会合を計測した報告例の大部分は、膜環境として界面活性剤ミセルを用いており、脂質二分子膜系での測定例は非常に少なかった。既存の測定系には問題点も多く、測定系開発は重要な課題である。生体膜(脂質二分子膜)の物性がどのように膜タンパク質構造安定性に影響するのか? アミノ酸配列と膜物性のどのような組み合わせが調節機構となりうるか?が学術的問いである。

2. 研究の目的

現在大部分が未解明である脂質による膜タンパク質制御原理の一端の解明を目指し、(1) 会合モチーフとして知られる GXXXG の周辺配列とコレステロールの組み合わせが、ヘリックス会合・会合体構造に与える影響を解明する。得られた知見を元に生細胞膜での膜タンパク質会合挙動も測定し一般性を検証する。(2) ヘリックスブレーカーとして知られるプロリンが誘起しうるヘリックス折れ曲がり構造が膜厚によりどのように調節されるか明らかにする。部位特異的に安定同位体標識したヘリックスを用い膜内折れ曲がり構造を詳細に調べる。

これらの課題を通して、タンパク質のアミノ酸配列と、脂質膜物性の組み合わせに強く依存して膜内ヘリックス間相互作用やヘリックス構造が大きく変化するメカニズムを解明する。

【学術的独自性と創造性】

これまで、膜貫通ヘリックスのアミノ酸配列に着目した研究、二分子膜の脂質組成に着目した研究はそれぞれ行われてきたが、生理的狀態を考えると当然研究すべきにもかかわらず、両者の影響を系統的に測定し統合的に解釈するアプローチは皆無だった。この現状を踏まえ独自に開発してきた、脂質二分子膜環境で測定が可能で従来法よりも定量性・一般性に優れ、膜内のヘリックス安定性・自己会合力を熱力学量 (G , H , S , C_p) や速度定数 (k_{on} , k_{off}) として評価できる実験系、および生細胞膜での会合測定系を活用し、膜貫通ヘリックスの会合・構造のアミノ酸配列・脂質依存性メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

GXXXG 周辺配列がコレステロール依存的会合に及ぼす影響の解明

膜貫通ヘリックス会合モチーフとして最も良く知られる GXXXG 配列は、必ずしも会合を駆動するとは限らず、周辺配列や脂質組成の影響を受ける可能性が指摘されている。GXXXG はヘリックス同士が時計回りに巻付く右巻き会合と、反時計回りに巻付く左巻き会合のいずれも駆動しうると考えられている。右巻き会合体のほうがヘリックス交差角が大きく、コレステロールはそのような会合体を安定化しうる。申請者はこれまでに、全ての膜貫通ヘリックスが共通して持つ basal な自己会合力を持つようデザインされたホスト配列(AALALAA)₃の膜貫通ヘリックス構造・会合挙動を明らかにしてきた。会合トポロジーを制御した会合実験から、ホストヘリックスは平行型では会合しないことが分かっている。この中心にゲスト配列 GXXXG を導入した GXG1 ヘリックスが、典型的なリン脂質膜パルミトイルオレイルフォスホコリン(POPC)中で、ヘリックスがほぼ垂直に配向した左巻き平行型会合体を形成するが、コレステロール添加によって会合しなくなる事を示してきた。そこで本研究では、GXG1 とは異なる会合体構造や会合の脂質依存性を持つ配列を見出すため、GXXXG 会合インターフェースの周囲に位置するアミノ酸 (X5, X6, X16, X17) を G, A, L に変異させた一連の GXG ヘリックスの自己会合力を測定する。POPC 膜およびコレステロール存在下で検討する。平行型会合を中心に調査するが、GXG1 は逆平行型会合でも会合するため、平行型で会合が見られた配列に関しては逆平行型会合も調べる。

GXXG1 とは異なる会合挙動・脂質依存性を示す配列が見つかった場合は、コントロールとして中心に GXXXG 配列を持たないヘリックスの会合も測定する。主にシングルペア蛍光エネルギー移動 (sp-FRET) 法で膜貫通ヘリックス会合を測定する。現在開発中の tether 膜法 [基盤研究 (C)16K08194] も、より迅速な解析が期待できるため開発状況に応じ併用する。ホスト配列との会合力の差 (G) から会合駆動配列の影響を定量する。ヘリックスの膜に対する配向角は偏光全反射赤外吸収 (PATR-FTIR) 法で測定する。周辺配列と会合力・会合体構造のコレステロール依存性から、その会合制御メカニズムを考察する。得られた会合ルールの一般性を検証するため、該当する GXXXG と周辺配列を持つ天然の一回膜貫通タンパク質を検索し、CHO 細胞でコイルドコイルラベル法による標識・会合状態解析を行う。細胞膜コレステロール量を減少させた条件でも測定する。周辺配列の変異体も作成して会合状態を調べ、モデル系で得られた知見と一貫した傾向が見られるか確認する。

4. 研究成果

GXXXG 配列の周囲に位置するアミノ酸 (5, 6, 16, 17 残基) を G, A, L に変異させた一連の膜貫通ヘリックスに関して、複数の配列の合成と測定を行った。蛍光色素 Cy3B および Cy5 で蛍光標識したペプチドを合成し、ジスルフィド結合を介して平行架橋体を合成した。シングルペア蛍光測定による自己会合力の測定および、蛍光輝点の解析を行った結果、多くの配列では POPC 膜、POPC/コレステロール膜のいずれでも強い会合が起こらなくなった。したがって、GXXXG の周辺配列は少し変化するだけでも会合力に大きく影響することが明らかになった。一方で、グリシンを 1 残基追加導入したある配列に関しては、コレステロール含有膜での会合が観測された。元の GXXXG 配列ではコレステロール含有膜では会合が見られなかったことから、何らかの特異的な構造を形成している可能性がある。

これらの変化のメカニズムを明らかにするために、アミノ酸配列から会合体構造を予測するプログラムである PREDDIMER を用いて、各配列の膜貫通ヘリックスがどのような会合体構造を形成しうるか調べた。結果、コレステロールを含まない膜中で安定化される会合体は小さなヘリックス交差角を持ちヘリックス同士が平行に並んだ構造を持つ一方で、コレステロール含有膜中で安定化される会合体は大きなヘリックス交差角を持ちヘリックスが X 字型に交差した構造を持つことが予測された。コレステロール含有膜は膜疎水部で高い側方圧を持つため、その側方圧を解消するように X 字型の会合体構造が安定化しうるかと解釈できる。これらの予測と実験結果を考え合わせると、GXXXG 周囲のアミノ酸配列によって取りうる会合体の交差角は異なるが、膜脂質の組成がそれらの会合体の安定性に大きく影響していると考えられた。

また、計画当初は予期できなかった結果として、GXXXG 配列を持っていても、グリシンを 4 箇所導入したヘリックス (GXXGXXXGXXXG) では会合が起こらないことが観測されていた。PREDDIMER では強いパッキングを持ち平行型会合体を形成することが予測されており、予測と実験が反する結果となった。この解釈として、側鎖の小さいグリシンの数が増加することで、ヘリックス主鎖のフレキシビリティが増大し、会合インターフェースが不安定化していることが考えられた。そこで、FTIR の amide I' 吸収スペクトルからヘリックス主鎖のフレキシビリティを比較した。グリシンを 4 つ含む配列では、amide I' の吸収スペクトルの半値幅が大きくなること、またサンブル調製によって吸収極大波長のばらつきが大きくなることが明らかになり、この解釈と一貫していることが明らかになった。また、GXXXG 配列をヘリックスの中心から N 末端に移動するとヘリックス会合に寄与しなくなることも確かめられた。これらを総合して、ヘリックス会合を促進することが知られている GXXXG 配列であっても、周囲のアミノ酸配列の影響とともに、膜組成 (コレステロール) の影響を大きく受け、繊細・複雑な膜貫通ヘリックス会合制御の挙動が観測された。このことは、アミノ酸配列と脂質の両者の相互作用が、生体膜中での膜タンパク質構造・機能の調整メカニズムになりうることを示唆している。また、膜タンパク質機能制御機構として重要な観点である、膜ドメインと膜タンパク質の相互作用について、膜ドメイン境界に分配しうる膜貫通ヘリックスの合成・観測系の検討を行った。

以上の結果は、1) アミノ酸配列によって、ある交差角を持つ安定なダイマー構造の候補が決まる一方、2) コレステロールによる膜疎水部での高い側方圧が、ダイマーの安定性に支配的な影響力を持つ (X 型のダイマーだけが安定に存在する) ことを示している。このルールは今回調査した配列だけではなく、多くの膜貫通ヘリックスで成立すると考えられる。本研究で明らかになった膜によるタンパク質構造制御ルールは膜タンパク質の新たな機能調節法の開発や人工膜タンパク質のデザインの基本情報として意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Yano	4. 巻 70
2. 論文標題 Effects of membrane cholesterol on stability of transmembrane helix associations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiaki Yano, Yuta Watanabe, and Katsumi Matsuzaki	4. 巻 1863
2. 論文標題 Thermodynamic and kinetic stabilities of transmembrane helix bundles as revealed by single-pair FRET analysis: Effects of the number of membrane spanning segments and cholesterol.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Biomembr.	6. 最初と最後の頁 183532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183532.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢野義明、森瀬敬之、松崎勝巳
2. 発表標題 INTERPLAY BETWEEN AMINO ACID SEQUENCES AND LIPID COMPOSITIONS IN THE GXXXG-MEDIATED SELF-ASSOCIATION OF TRANSMEMBRANE HELICES AS REVEALED BY SINGLE-PAIR FRET
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Morise, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki
2. 発表標題 Single-Pair FRET measurement of GXXXG-mediated transmembrane helix associations -high sensitivity to the surrounding residues-
3. 学会等名 The 11th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野義明
2. 発表標題 膜タンパク質の構造安定性における脂質の役割
3. 学会等名 タンパク質研究所セミナー 生体膜上の生物化学（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関