

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21590037

研究課題名（和文） 細胞膜局所構造解析による膜ドメイン形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） Formation of microdomains in cell membranes investigated by microscopic analyses of structures of membranes and proteins

研究代表者

三浦 隆史 (MIURA TAKASHI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：30222318

研究成果の概要（和文）：

アミロイドβペプチド (Aβ) 単量体はホスファチジルコリンのみから成る脂質膜に対しては、ラメラゲル相の場合のみ結合し、液晶相では結合しない。脂質分子が密にパッキングした膜はペプチドの非静電相互作用による膜結合および分子間会合の場を提供する可能性がある。一方、凝集してβシート構造を形成した Aβはゲル層と液晶相の両方のホスファチジルコリン膜に対して結合する。凝集 Aβの結合は液晶相膜の流動性を顕著に低下させる。

研究成果の概要（英文）：

The monomeric amyloid peptide (Aβ) binds to the phosphatidylcholine membrane in the lamellar gel phase but not in the liquid crystalline phase. Tightly packed phosphatidylcholine membranes appear to serve as a platform for non-electrostatic binding and self-association of Aβ. On the other hand, aggregated Aβ peptides bind to the phosphatidylcholine membrane both in the lamellar gel and the liquid crystalline phases. The binding of aggregated Aβ significantly reduces fluidity of the membrane in the liquid crystalline phase.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物構造化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学、脂質膜、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質のうち、ホスファチジルコリンに代表されるグリセロリン脂質

はシス型の二重結合を持つものが多く、スフィンゴミエリンやガングリオシドのようなスフィンゴ脂質は飽和炭化水素鎖を持った

め、本来、これらは互いに混ざり合い難い。近年、細胞膜内にスフィンゴ脂質とコレステロールが局在する領域が現れる証拠が集積されており、これらは膜ドメイン（またはラフト）と呼ばれている。膜ドメインは、細胞の機能発現に際して、必要なときに必要な部品を集めるための動的かつ機能的な分子群であると考えられている。例えば、T細胞シグナル伝達の際などには、刺激に応じてマイクロメートルスケールの大きいドメインが細胞膜に現れ、このドメインにシグナル伝達に関わるタンパク質が集積される。膜ドメインが必要なタンパク質を集めるメカニズムの一部については、タンパク質が脂肪酸修飾を受けることにより膜ドメインに対する親和性を増すことで説明されている。しかし、タンパク質と脂質膜の直接相互作用に起因するとみられる集積のメカニズムは未だ解明されていない。

申請者は、膜ドメインに結合する性質を持つタンパク質と脂質膜の相互作用に関する構造生物学的研究を行ない、タンパク質の構造およびタンパク質の脂質膜に対する親和性が共に、液晶相 - ゲル相のような脂質膜の状態に依存して変化することを見出し、速報誌に発表した [Biochem. Biophys. Res. Commun. 376, 56-59 (2008)]。得られた知見は、ある種のタンパク質の膜ドメイン内への移行は、翻訳後修飾ではなくタンパク質の構造変化によって制御されることを示唆する。一方で、脂質分子も、膜ドメイン形成により炭化水素鎖のコンホメーションや極性基における分子間水素結合状態などが変化すると予想される。したがって、細胞膜内でドメインが形成される過程において、脂質やタンパク質が単に膜内を移動するだけでなく、個々の分子の構造が変化し、この構造変化が膜ドメインへのタンパク質の集積を制御する一因となっている可能性がある。以上の背景から、膜ドメインの形成メカニズムを解明するためには、細胞膜を構成する脂質とタンパク質の構造変化を捉えることが必要であると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、膜ドメインがどのような分子機構に基づいて形成され、タンパク質の機能を制御しているかを、細胞の局所構造を解析するための新しい手法を用いて、構造生物学の立場から解明することを目的とした。明らかにすることを目指したのは、主に次の2点である。

(1) 生細胞に生じる膜ドメインの構造を明

らかにする。細胞膜に膜ドメインが形成されることは、過去の研究により確認されているが、その構造は解明されておらず、適用可能な解析手法も存在していなかった。本研究では、顕微ラマン分光法を利用する新しい手法を用いて、生きた細胞に生じる膜ドメイン内の脂質分子などの構造を初めて明らかにする。さらに、ドメイン形成過程で膜内に何が起きているのかを明らかにする。

(2) 脂質膜構造のタンパク質による制御メカニズムを明らかにする。あるタンパク質が周囲の脂質膜をゲル相（または秩序液体相）様の構造に変化させる作用を持つならば、そのタンパク質は膜ドメインに取り込まれ易くなると予想される。逆に、そのようにして生じたタンパク質 - 脂質クラスターが核となり、膜ドメイン形成を誘起する可能性もある。実際、蛍光を利用した過去の研究により、ある種のタンパク質は脂質膜の流動性を顕著に低下させることがわかっているが、その原因は不明である。本研究では、主にラマン分光法を用いて、リポソーム膜内の脂質分子のコンホメーションと水素結合状態を解析し、タンパク質分子による脂質膜の構造、硬さ、および流動性の調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脂質膜の構造を反映するラマンマーカ一の探索

親水基部分に水素結合のプロトンドナーとアクセプターを共に持つスフィンゴ脂質が膜内で集合すると、分子間水素結合のネットワークが形成され、これがドメインの安定化に寄与する可能性が指摘されている。したがって、タンパク質が脂質膜の水素結合状態に及ぼす影響を調べることは、膜ドメインの形成メカニズムを解く鍵になる可能性がある。ラマン分光法は水素結合状態の解析手段として優れているが、スフィンゴ脂質のラマンスペクトルについては、過去の研究例が少ないため、水素結合のマーカバンドを新たに見出す。一方、炭化水素鎖コンホメーションも膜ドメインの形成に伴い変化することが予想される。コンホメーションについては、ラマンスペクトルを用いた既知の解析法が利用可能である。

①スフィンゴ脂質を種々の有機溶媒に溶解してラマンスペクトルを測定した。濃度、温度等を変えることにより引き起こされるスペクトル変化を解析し、極性基の水素結合状態を反映するラマンバンドを見出した。

②温度変化により、細胞膜と類似する組成を持つモデル脂質膜を相分離状態へと導き、その際のラマンスペクトル変化を解析した。上記の水素結合およびコンホメーションマーカーを利用して、膜ドメイン形成に伴う分子レベルでの構造変化を追跡した。

(2) 脂質膜構造のタンパク質による制御メカニズムの解明

スフィンゴ脂質、コレステロールなどを含む細胞膜に近い組成を持つリポソームを調製する。膜ドメインに対して高い親和性を示すタンパク質（またはペプチド）をリポソームに添加し、タンパク質が脂質膜の構造と流動性に与える影響、逆に脂質膜がタンパク質構造に与える影響を CD、蛍光、ラマン分光法を駆使して詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) スフィンゴミエリンの水素結合マーカーとなるラマンバンド

膜ドメインの主成分であるスフィンゴミエリンは水素結合のプロトン・アクセプターしか持たないホスファチジルコリンとは異なり、ドナーおよびアクセプターとなるアミド基と水酸基を持つ。スフィンゴ脂質に特有の水素結合形成が、膜ドメイン形成において重要な役割を持つ可能性があるため、膜中における脂質分子の水素結合状態を探ることはドメイン形成メカニズムを明らかにする上で重要である。スフィンゴミエリンのラマンスペクトルに観測されるアミド I バンドは、アミド基の水素結合状態のマーカーとして利用できる可能性があるが、C=C 結合の伸

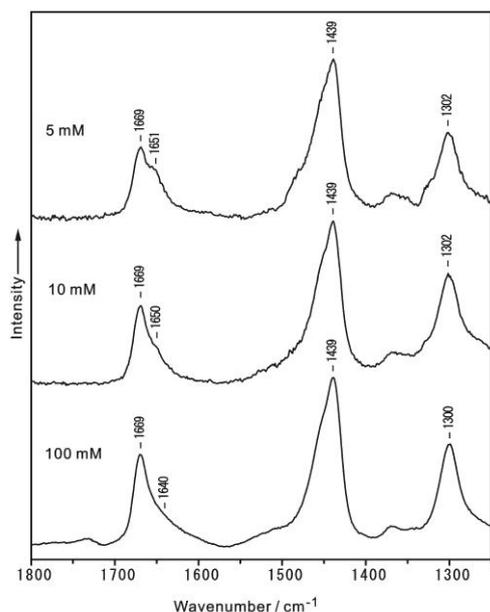


図1. クロロホルム溶液中スフィンゴミエリンの 488.0 nm 励起ラマンスペクトル. 上から 5, 10, 100 mM.

縮振動が近くに存在するため、これらのバンドの帰属は曖昧であった。本研究では、有機溶媒中におけるスフィンゴミエリンのラマンスペクトルを測定し、アミド I バンドの帰属を行なった。また、スペクトルと水素結合状態との関係を調べた。

メタノール溶液中で測定したスフィンゴミエリンのラマンスペクトルには、 1671 cm^{-1} にピークを持つ強く鋭いバンドとその肩バンド ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$) が観測された。スフィンゴミエリンを重水素化メタノールに溶解しアミド基の NH 等を重水素置換すると、 1671 cm^{-1} バンドが変化しないのに対して、肩バンドは低波数シフトしたことから、後者がアミド I であると帰属することができた。

次にスフィンゴミエリンのクロロホルム溶液のラマンスペクトルを測定した (図1)。メタノールとは異なり、クロロホルムは水素結合のプロトン・ドナー性とアクセプター性をほとんど持たない溶媒である。5 mM 溶液のラマンスペクトルには、アミド I バンドは 1651 cm^{-1} に明瞭な肩バンドとして観測された (図1上)。これは水素結合していないスフィンゴミエリンのアミド I バンドと考えられる。一方、スフィンゴミエリンの濃度上昇に伴い、肩バンドは徐々に不明瞭となり、100 mM ではメタノール溶液中で観測されたような幅広い肩バンドになった (図1下)。高濃度ではスフィンゴミエリンは分子間で水素結合を形成すると考えられる。このとき、スフィンゴミエリンのアミド基はドナーとして、アクセプターとして、あるいはその両方として水素結合する可能性がある。また、水素結合の相手としては、アミド基、水酸基、リン酸基などが考えられる。多様な水素結合状態を反映して、アミド I は幅広いバンドとして観測されるようになったと考えられる。ラマンスペクトルに観測されるスフィンゴミエリンのアミド I バンドは、C=C 伸縮振動と一部重なるものの、その波数やバンド幅により水素結合状態に関する情報を与えることがわかった。

(2) ペプチドと脂質膜の結合に対する膜の相状態の影響

アミロイド β ペプチド ($A\beta$) は液晶相およびリップルゲル相のホスファチジルコリン膜には結合しないが、ラメラゲル相の膜に対しては結合し、 α ヘリックスまたは β シート構造を形成する [Yoda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 56-59 (2008).]. 本研究では、これと同様のことが $A\beta$ 以外のペプチド、もしくはホスファチジルコリン以外の脂質で

も観測されるか調べた。

プリオンタンパク質 (PrP) は、脳内において分子間会合して β シートに富む構造に転移し、神経変性疾患を引き起こす点において $A\beta$ と共通する特徴を持つ。PrPの中で、病原型構造への転移に特に重要と考えられている、N末端の銅結合領域とC末端の球状構造を繋ぐリンカー部を断片化したペプチドPrP99-126とホスファチジルコリン膜の結合を調べた。その結果、PrP99-126も $A\beta$ と同様にラメラゲル相の膜に対して選択的に結合することがわかった。

細胞膜において $A\beta$ 集積の場となると予想されている膜ドメイン (脂質ラフト) はホスファチジルコリンなどのグリセロリン脂質よりもスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質に富むと考えられている。そこで、 $A\beta$ のスフィンゴミエリン膜に対する結合を調べたところ、この場合もラメラゲル相の膜に対する選択的な結合が観測された。 $A\beta$ が細胞膜の膜ドメインに集積するのは、膜ドメインにおいて、スフィンゴミエリン分子が密にパッキングされていることが原因のひとつである可能性がある。

(3) $A\beta$ の結合が脂質膜の流動性に与える影響

ホスファチジルコリン膜に対する $A\beta$ の結合、および結合が脂質二重膜の流動性に与える影響を調べた。 $A\beta$ 1-40は液晶相のPC膜には結合せず、ラメラゲル相のPC膜に対してのみ結合するのに対し、 $A\beta$ 1-42は液晶相とゲル相のどちらのPC膜に対しても結合する。 $A\beta$ 1-42の結合により、液晶相PC膜の流動性は顕著に減少し、特にペプチド高濃度ではゲル相膜の流動性に匹敵する程にまで低下した。次に、液晶相膜に対する親和性および流動性に与える影響が $A\beta$ 1-40と $A\beta$ 1-42とで大きく異なる原因を調べた。その結果、 $A\beta$ 1-40は水溶液中で不規則構造のモノマーとして存在するのに対し、 $A\beta$ 1-42は溶解直後から分子間で会合し、 β シートを形成していることがわかった。即ち、 $A\beta$ モノマーは液晶相膜に対しては、膜表面に負電荷が存在しない限り結合しないが、オリゴマー化した $A\beta$ は結合し、膜の流動性を低下させると考えられる。

$A\beta$ 1-42オリゴマーの結合が膜の構造に与える影響をラマン分光法により調べた。結合により、液晶相のPC膜の流動性がゲル相に匹敵するレベルまで低下することから、脂質炭化水素鎖のコンホメーション変化が引き起こされると予想されたが、 $A\beta$ 1-42オリゴマーが結合しても、トランス型とゴーシュ型のコンホメーション比にほとんど変化は見られなかった。

これらの知見は、アルツハイマー病の原因となる、脂質膜上における $A\beta$ 集積・会合のメカニズムを解明するうえで、重要な鍵となると考えられる。また、本研究により、オリゴマーの結合による流動性の低下が脂質ラフト形成の契機となる可能性も示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. “Conformational Regulation of Amyloid Beta-Peptide by Lipid Membranes and Metal Ions.”

Takashi Miura, Mayumi Yoda, Chihiro Tsutsumi, Kiyoko Murayama and Hideo Takeuchi

Yakugaku Zasshi, **130**, 495-501 (2010) 査読有

2. “Regulation of secondary structure of peptides by lipid membranes.”

Takashi Miura

Seibutsu Butsuri, **50**, 184-185 (2010) 査読有

3. “Role of His16 in the structural flexibility of the C-terminal region of human endothelin-1”

Hirotsugu Hiramatsu, Hiroki Aduma, Yuriko Tanaka, Takashi Miura, and Hideo Takeuchi
J. Mol. Struct. 976, 328-332 (2010) 査読有

4. “Interactions between histidine and tryptophan residues in the BM2 proton channel from influenza B virus.”

K. Otomo, A. Toyama, T. Miura, H. Takeuchi
J. Biochem. 145, 543-54 (2009) 査読有

[学会発表] (計9件)

1. スフィンゴ脂質を含む脂質膜とアミロイド β ペプチドとの相互作用

東海林秀樹、三浦隆史、竹内英夫

第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台

2. HIV-1 ウイルスのVprタンパク質におけるカチオン- π 相互作用

上山貴之、三浦隆史、竹内英夫

第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011 年
10 月 30 日、仙台

3. Ctrlによる銅イオン細胞内取り込みの分
子メカニズム

Molecular mechanism of copper uptake by
Ctrl

三浦隆史

化学系学協会東北大会、2011年9月17日、仙台

4. Structural Polymorphism and Copper
Transport Function of the Extracellular
N-Terminal Domain of Ctrl

Takashi Miura, Shiho Saito, Ako Okawara,
Kenji Itoh, Shintaro Yamazaki and Hideo
Takeuchi

2010 International Chemical Congress of
Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010),
Honolulu, U.S.A. 2010年12月15日-19日

5. 脂質分子のパッキングがアミロイドβペ
プチドと脂質膜の相互作用に与える影響

東海林秀樹、依田真由美、三浦隆史、竹内英
夫

第 48 回生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日
-22 日、仙台

6. タンパク質中におけるカチオン- π 相互
作用の強さの評価

上山貴之、三浦隆史、竹内英夫

第 48 回生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日
-22 日、仙台

7. エンドセリン 1 の構造安定性に対する
His16の役割

平松弘嗣、我妻弘基、田中友里子、三浦隆史、
竹内英夫

第 37 回 生体分子科学討論会. 2010 年 6 月
18 日-19 日、山口

8. 脂質膜により誘起されるタウ微小管結合
領域の構造転移と線維形成

益山純英、飛田英里、三浦隆史、竹内英夫

第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10
月 18 日、仙台

9. 脂質膜によるタウ微小管結合領域の構造
転移と線維形成

益山純英、飛田英里、三浦隆史、竹内英夫

第36回生体分子科学討論会、2009年6月19日
-20日、札幌

[その他]

ホームページ等

1. 東北大学大学院薬学研究科、生物構造化
学分野ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~kouzou/kouzou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 隆史 (MIURA TAKASHI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 : 30222318

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :