

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01725

研究課題名(和文) 曲面生体膜材料を利活用した曲率認識タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Exploration of membrane curvature sensing protein using a series of spherical supported lipid bilayers

研究代表者

田中 祐圭 (Tanaka, Masayoshi)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：60533958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内で見られる様々な曲面生体膜の構造制御機構において、特定の曲率を持つ曲面生体膜と相互作用し、構造を制御する“膜曲率認識タンパク質”が重要な役割を果たす。代表者田中はこれまでに、この膜曲率認識タンパク質の網羅的な探索技術の開発を進めてきた。本研究では、これまでに同定されてきた候補タンパク質の機能解析を実施し、標的タンパク質の曲率認識能の発現に寄与する脂質を特定した。さらに、原核細胞である大腸菌からも探索を進め、新規膜曲率認識タンパク質を特定し、膜曲率認識タンパク質の幅広い生物における普遍性について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞形態と機能発現の相互関係が近年注目されている。本研究では、この細胞膜の構造を決める膜の曲率認識タンパク質を探索する手法を開発し、この手法が大腸菌などの原核生物にも適用できることを示した。また、がん細胞から同定されたタンパク質が曲率認識能の発現に重要な役割を果たす脂質分子を特定した。今後、これらの機能をさらに詳細に明らかにすることで、がんマーカーやがんの悪性度の指標となるようなタンパク質が同定できることが期待される。このような技術が報告された例はなく、今後、様々な生物から膜構造を決めるタンパク質が見つかり、病気の原因となるタンパク質などを特定できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the mechanism of structural control of various curved biological membranes observed within cells, "membrane curvature-sensing proteins" that interact with and control the structure of membranes with specific curvatures play an important role. The representative, Tanaka, has been advancing the development of comprehensive exploration techniques for these membrane curvature-sensing proteins.

In this study, we conducted functional analysis of candidate proteins that have been identified so far and identified the lipids that contribute to the expression of curvature-sensing ability of the target proteins. Furthermore, we expanded the search to the prokaryotic cell *Escherichia coli*, identified novel membrane curvature-sensing proteins, and elucidated the universality of membrane curvature-sensing proteins across a wide range of organisms.

研究分野：生体分子化学

キーワード：膜曲率認識タンパク質 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

小胞体やミトコンドリア内膜のクリステに代表されるように、細胞内には非常に複雑な曲面生体膜構造が観察される。これらの膜構造は分裂、融合などを繰り返す過程で、平面生体膜→曲面生体膜→小胞構造のように構造が動的に変化する。このような生体膜構造の制御プロセスにおいて、構成する脂質成分の非対称性や細胞骨格タンパク質の作用などに加えて、生体膜の曲面構造(曲率)を識別し、構造を制御する“曲率認識タンパク質”の重要性が示されている。そこで研究代表者は、これまでに異なる曲率の曲面生体膜材料(SSLB:Spherical Supported Lipid Bilayer)を調製し、これらに対する比較相互作用解析に基づく、曲率認識タンパク質の網羅的な探索技術の開発を進めてきた。これにより、複数の曲率認識タンパク質が新たに同定されたもののその膜曲率認識機構の詳細は不明であり、さらにこの曲率認識タンパク質探索技術の汎用性は不明であった。

2. 研究の目的

代表者田中はこれまでに、サイズの異なる球形 SiO₂ 粒子を生体膜で被覆することで、様々な曲率の曲面生体膜材料(SSLB:Spherical Supported Lipid Bilayer)を調製し、タンパク質画分の粒径の違いによる比較相互作用解析に基づく曲率認識タンパク質の探索技術を開発してきた。本研究では、この技術を活用することで曲率認識タンパク質の探索と機能解析を進める。具体的には、候補タンパク質の曲率認識能の発現に必要な成分(補助タンパク質や脂質)を明らかにする。さらに、この技術を用いて原核生物である大腸菌から曲率認識タンパク質の探索を行う。

3. 研究の方法

a. 異なる曲率の生体膜をもつ材料(SSLB)の調製

アンモニア触媒による Tetraethyl orthosilicate (TEOS)の加水分解反応を利用し、粒径 100, 1000 nm の SiO₂ 粒子を合成した。これを小型単層リポソーム(SUV)と混合することで、曲率の異なる生体膜をもつ SSLB を調製した。より具体的には、大腸菌からメタノールクロロホルム法により抽出した混合脂質を使用し、ガラス表面で混和しながら乾燥させることで脂質フィルムを作成した。その後、PBS バッファーを加えてボルテックスで混合し、さらに Tip sonicator を用いて SUV を調製した。得られた各サイズの SiO₂ 粒子の表面積に対して、3 倍程度の脂質成分を含んだ SUV と 45°C、1 時間混和した。遠心分離により洗浄した後に、得られた SSLB を蛍光顕微鏡並びに走査型電子顕微鏡観察により評価した。

b. 大腸菌から生体膜曲率認識タンパク質の探索

大腸菌破砕液を遠心分離し、可溶性タンパク質画分を取得後、さらに超遠心分離を行うことで細胞膜および膜タンパク質画分を取得した。その後、細胞膜に対して静電相互作用によって結合している表在性膜タンパク質を取得するため、2.5M の臭化ナトリウム溶液中で混和させ、再度超遠心分離することで、大腸菌の表在性膜タンパク質画分を取得した。透析した表在性膜タンパク質画分とサイズの異なる SSLB との共沈試験を実施し、結合したタンパク質について、LC-MS/MS により比較定量解析を実施した。この際、実験に使用した 100 nm と 1000 nm の粒子は、表面積の総和が等しくなるように調整した。曲率認識能の評価には、各 SSLB 上から検出されたタンパク質のスペクトルカウントをもとに、フィッシャーの正確確率検定による有意差判定 ($p < 0.01$) に基づき選抜した。

c. 候補タンパク質を精製し、単一タンパク質による曲率認識能の評価

得られた曲率認識タンパク質候補群のうち、標的タンパク質を選定し、大腸菌での発現および精製を行った後、脂質膜修飾 SiO₂ 粒子との共沈試験に供することで、*in vitro* での曲率認識能の確認を実施した。

ここではすでに曲率認識能をもつことが知られる大腸菌のタンパク質 FtsZ をモデルタンパク質として調製し、表面積を揃えたサイズの異なる SSLB との共沈試験により曲率認識能の評価条件を最適化した。標的タンパク質として、膜上に局在することが知られるもののその曲率認識能については全く報告のない SecA タンパク質を対象とした。精製したタンパク質 50 μ g と表面積を揃えたサイズの異なる SSLB と 4°C で一晩混和した。これを遠心分離し、沈殿を SSLB 結合画分、そして上清を非結合画分とした。それぞれのサンプルについて Laemmli sample buffer で溶出し、電気泳動による解析を阻害する脂質成分を除去するためにアセトン沈殿して得られたサンプルを再度 Laemmli sample buffer で懸濁して SDS-PAGE により評価した。Coomassie Brilliant Blue R-250 により染色後に、得られるタンパク質バンドの輝度から、標的タンパク質の異なる曲率の生体膜に対する結合性を評価した。

d. 乳がん細胞に特徴的に発現する曲率認識候補タンパク質の脂質結合能の評価

これまでの研究で同定されてきた乳がん細胞 MDA-MB-231 に特徴的に発現している曲率認識候補タンパク質 X について、その脂質結合能を Lipid strip を用いて評価した。具体的には、候補タンパク質 X を HEK293T 細胞内で発現させ精製したのちに、異なる脂質がドットプロットされている Lipid strip (Avanti polar lipids) に対して結合試験を行い、抗体染色することで結合能を評価した。

4. 研究成果

a. 異なる曲率の生体膜をもつ材料 (SSLB) の調製

まず、様々な曲率をもつ安定な曲面生体膜を調製するために、足場となる粒径 50~1,000 nm 程度の球形 SiO₂ 粒子を合成した。得られた粒子について蛍光標識脂質を含む大腸菌由来の混合脂質で被覆し、これによって得られた SSLB を蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、明視野顕微鏡観察によって観察される球形 SiO₂ 粒子と同じ部位から、蛍光脂質に由来する赤色蛍光が観察された。また、脂質による被覆前後の粒子表面の走査型電子顕微鏡画像では、脂質修飾による粒子表面の有機被膜の存在が確認された。以上より、本手法により曲率が異なる (粒径の異なる) 安定な曲面生体膜構造をもつ球形材料 (SSLB) を調製できたことが確認された (図 1)。

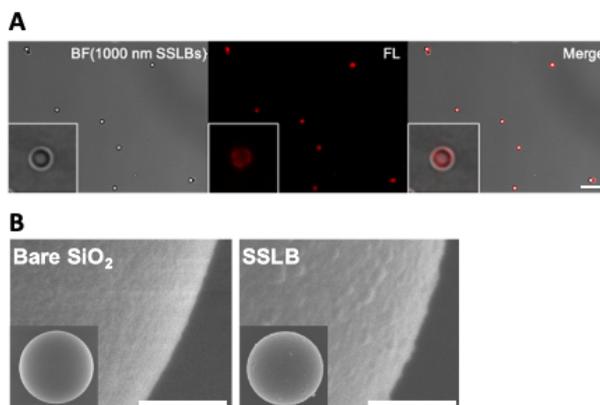
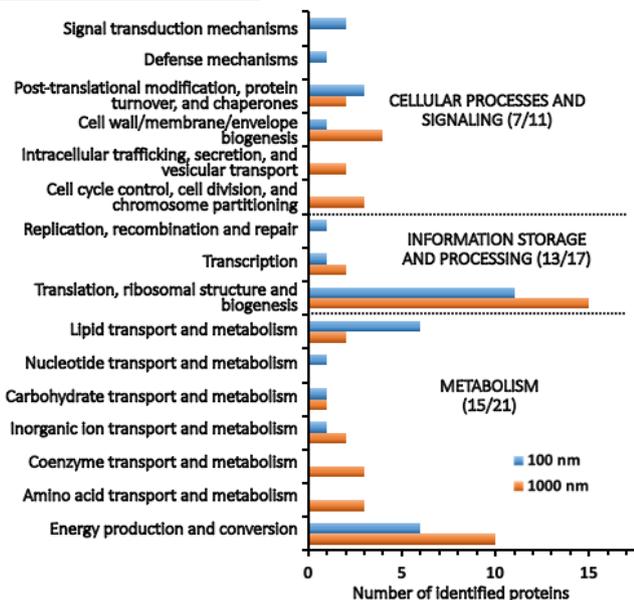


図 1 球形 SiO₂ 粒子を生体膜で被覆することによる SSLB の調製

- A) 左：合成した SSLB 粒子の位相差顕微鏡像、右：SSLB 粒子の蛍光顕微鏡画像 (表面の脂質膜に赤色蛍光脂質を添加)
 B) 左：合成した球形 SiO₂ 粒子の走査型電子顕微鏡像、右：SSLB 粒子の走査型電子顕微鏡像

b. 大腸菌から生体膜曲率認識タンパク質の探索

SSLB との共沈試験により取得した、膜結合性タンパク質画分をプロテオーム解析に供した結果、合計で 438 種のタンパク質を同定した。これらのタンパク質について統計解析による曲率認識能の評価を実施し、100 nm に高い親和性を示すタンパク質として 35 種、1000 nm からは 47 種の曲率認識候補タンパク質を取得した。これらを KEGG により機能分類したところ図 2 に示される結果が得られた。これをもとに細胞膜に関連する機能分類のタンパク質を選抜し、その中から既知の曲率認識タンパク質である FtsZ に加えて SecA タンパク質を以降の実験に用いることにした。



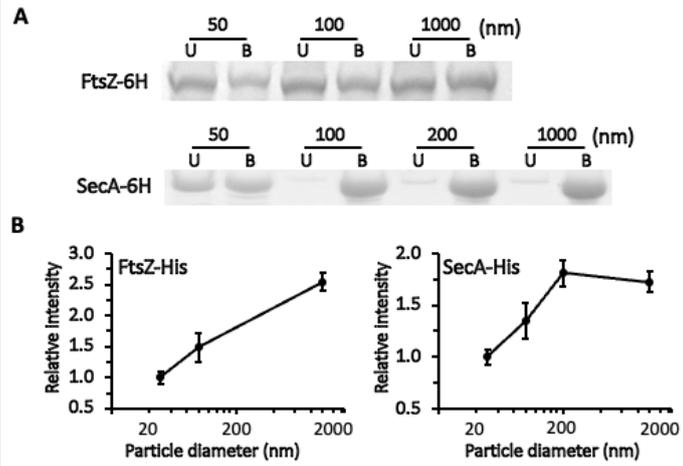
c. モデルタンパク質を利用した SSLB による曲率認識タンパク質同定技術の開発

b で選抜された FtsZ 及び SecA タンパク質について大腸菌を用いて精製タンパク質を調製した。具体的には、大腸菌からゲノムを抽出し、そこから PCR により目的遺伝子を pET21b にクローニングした。IPTG によって強発現される His タグ標識タンパク質を Ni-NTA カラムで精製し、脱塩したのちに、サイズの異なる SSLB との結合試験を行った。その結果、FtsZ や SecA それぞれにおいて、1000 nm の SSLB への優位な結合を示す曲率認識能の存在を明らかにされた (図 3)。これによりこれまで我々が開発を進めてきた真核生物に対する曲率認識タンパク質の探索技術は、その条件を最適化することで原核生物にも適用できることが示された。さらにこれまでにその曲率認識能について全く注目されていない SecA タンパク質について、今回の研究で初めて曲率認識能をもつことが示され、今後この曲率認識能がどのように SecA が本来持つ、タンパク質の輸送機構に寄与するのかについて明らかにする予定である。

図 2 大腸菌から同定された曲率認識タンパク質の機能分類

図 3 精製した FtsZ と SecA タンパク質と表面積を揃えた様々な粒径の SSLB との共沈試験による曲率認識能の評価

(A) SSLB に結合および非結合タンパク質を電気泳動 (SDS-PAGE) により評価、(B) 電気泳動で確認されるタンパク質量の評価 (1 μm の SSLBs への結合量を 1 としている)



d. 乳がん細胞に特徴的に発現する曲率認識候補タンパク質の脂質結合能の評価

精製された乳がん細胞で特徴的に発現する曲率認識候補タンパク質 X を用いて、Lipid Strip との結合試験を行ったところ、このタンパク質 X がイノシトール系の特定の脂質 Y に結合することが示された。そこでこの脂質を含む、または含まない混合脂質それぞれを用いてサイズの異なる SSLB との結合試験を行ったところ、この脂質 Y の有無によってタンパク質 X の曲率認識能が劇的に変化することが確認された。本結果は、タンパク質による生体膜の曲率認識メカニズムの本質に迫る成果であり、今後の詳細な解析が期待される。

以上のように本研究では、人工的に調製された曲面生体膜材料を利用することで、原核生物から曲率認識タンパク質を選択的かつ網羅的に同定できることが示された。本手法には、次のような利点がある。

- 1) 混合タンパク質溶液から曲率認識タンパク質を選択的・網羅的に探索できる
- 2) 複合体を形成するタンパク質をまとめて同定できる
- 3) タンパク質が最も強く相互作用する生体膜の曲面構造 (曲率) を推算できる

これらの特徴は、これまで対象とされてこなかった細胞や生物での曲率認識タンパク質の探索や機能解析を行う上で非常に有用である。今後は、本研究で同定された曲率認識タンパク質の詳細な機能解析によって、細胞機能の発現や疾病に深く関与する曲面生体膜構造の制御機構の理解が飛躍的に進むことが期待される。さらに曲率認識タンパク質と脂質との相互作用についても新たな知見が得られつつあり、今後の研究展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Ito Kazuma, Tanaka Masayoshi, Sugiura Kei, Hoshino Ayuko, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Kenji, Okochi Mina	4. 巻 146
2. 論文標題 A peptide binding to the tetraspanin CD9 reduces cancer metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials Advances	6. 最初と最後の頁 213283 ~ 213283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioadv.2023.213283	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 該当する
1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Usuba Kei, Kuroha Kotomi, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina	4. 巻 13
2. 論文標題 Screening of EWI-2-Derived Peptides for Targeting Tetraspanin CD81 and Their Effect on Cancer Cell Migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13030510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Masayoshi, Ueno Yu, Miyake Takahiro, Sakuma Takahiro, Okochi Mina	4. 巻 133
2. 論文標題 Enrichment of membrane curvature-sensing proteins from Escherichia coli using spherical supported lipid bilayers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.10.003	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 Saito Shogo, Tanaka Masayoshi, Tatematsu Soichiro, Okochi Mina	4. 巻 131
2. 論文標題 Peptide-modified substrate enhances cell migration and migrasome formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112495 ~ 112495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112495	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 Tanaka Masayoshi, Hayashi Mirei, Roach Lucien, Kiriki Yuka, Kadonosono Tetsuya, Nomoto Takahiro, Nishiyama Nobuhiro, Choi Jonghoon, Critchley Kevin, Evans Stephen D., Okochi Mina	4. 巻 131
2. 論文標題 Synthesis of near-infrared absorbing triangular Au nanoplates using biomineralisation peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 519 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.06.010	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 該当する

1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Tanaka Masayoshi, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Kenji, Okochi Mina	4. 巻 57
2. 論文標題 Inhibition of cancer-cell migration by tetraspanin CD9-binding peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 4906 ~ 4909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC01295A	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 Suwatthanarak Thanawat, Thiodorus Ivan Adiyasa, Tanaka Masayoshi, Shimada Taisuke, Takeshita Daiki, Yasui Takao, Baba Yoshinobu, Okochi Mina	4. 巻 21
2. 論文標題 Microfluidic-based capture and release of cancer-derived exosomes <i>via</i> peptide?nanowire hybrid interface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 597 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0LC00899K	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 Tatematsu Soichiro, Ohnishi Tomoko, Saito Shogo, Tanaka Masayoshi, Hayamizu Yuhei, Okochi Mina	4. 巻 170
2. 論文標題 Assemblies of bi-functional peptides on pyrolytic graphite for cell adhesion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 107988 ~ 107988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bej.2021.107988	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 Tanaka Masayoshi, Kiriki Yuka, Kiyohara Nozomi, Hayashi Mirei, Tamang Abiral, Nakamura Tomonori, Vacha Martin, Choi Yonghyun, Choi Jonghoon, Yoshida Wataru, Critchley Kevin, Evans Stephen D., Okochi Mina	4. 巻 7
2. 論文標題 Small Au Nanoparticles Synthesized by Peptide-Based Biomineralization for Catalytic Applications	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 11258 ~ 11266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.4c00780	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8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Exploration of membrane curvature sensing proteins from breast cancer cell using artificially designed membrane curvatures
3. 学会等名 The 27th Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Peptide-based biomineralization of near-infrared absorbing triangular gold nanoplate
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Proteomic Exploration of Cancer-Derived Membrane Curvature Sensors using a Series of Spherical Supported Lipid Bilayers
3. 学会等名 Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Technique Development for the Exploration of Membrane Curvature Sensing Proteins Using Spherical Supported Lipid Bilayers
3. 学会等名 Korean Society for Biomaterials 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 祐圭
2. 発表標題 生体膜の曲面構造を制御したネオホストの構築
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 祐圭
2. 発表標題 生体膜曲率認識タンパク質の網羅的探索技術の開発
3. 学会等名 日本膜学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Bioinspired peptide matrix for the detection 2,4,6-trinitrotoluene and exploration of membrane curvature sensors
3. 学会等名 2023 International Forum on Functional Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka
2. 発表標題 Exploration of membrane curvature sensors and gold bionanomineralization peptides
3. 学会等名 2023 The Korean BioChip Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP http://matanaka.cap.mac.titech.ac.jp/index.html 研究紹介動画 https://www.youtube.com/watch?v=Qz9nbHvXRGo

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
研究分担者	大河内 美奈 (Okochi Mina) (70313301)	東京工業大学・物質理工学院・教授 (12608)	

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		
	英国	University of Leeds	Sheffield University
韓国	Chung-Ang University		