

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460034

研究課題名(和文) 膜貫通ヘリックス間相互作用の一分子ダイナミクス計測：アミノ酸配列・脂質組成の影響

研究課題名(英文) Association dynamics of transmembrane helices detected by single-molecule FRET

研究代表者

矢野 義明 (Yano, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60402799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は多くの薬の標的となっているが、膜内での蛋白質安定性に寄与する駆動力がどのような性質か不明な点が多い。本課題では膜タンパク質の基本骨格である膜貫通ヘリックスを形成するモデルペプチドを用いて、リボソーム内での会合-解離挙動を一分子蛍光励起エネルギー移動法で検出する手法を確立した。ヘリックス会合モチーフGXXXG導入により平行型ヘリックス会合が見られ、二回膜貫通同士も会合する事が明らかになった。また多くの膜タンパク質活性に影響するコレステロール添加により、GXXXGヘリックスの平行型会合は抑制された。このようにアミノ酸配列と脂質の両方がヘリックス間相互作用に影響することが実証された。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins are important drug targets. However, driving forces that determine stability of proteins in membranes are poorly understood. In this project, association-dissociation dynamics of transmembrane helices were studied by single molecule FRET in liposomes to elucidate the rule of protein sequences and membrane lipids on helix association. A GXXXG motif was confirmed to drive parallel association of transmembrane helices (AALALAA)₃. Moreover, two-transmembrane peptides were found to form four-transmembrane bundle. Membrane cholesterol significantly affected self-association property of the transmembrane helices. These results demonstrate the importance of protein sequence, lipid composition, and their combination on the stability of intramembrane helix-helix interactions.

研究分野：生体膜の生物物理化学

キーワード：膜タンパク質フォールディング モデル膜貫通ヘリックス 一分子FRET

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR)、EGF 受容体など、創薬の重要なターゲット分子の多くは、膜貫通ヘリックス構造を基本骨格とする膜貫通型タンパク質である。膜環境 (=脂質二分子膜中)でのタンパク質構造形成原理は、疎水性相互作用が存在しない、また誘電率が低いいため静電的相互作用が大きく働くなど水中とは全く異なる。さらに生体膜を構成する脂質は多種多様であり、それらが膜タンパク質活性に大きく影響する例も多数報告があることから、膜環境・脂質依存性を考慮することも極めて重要であるが、膜環境中でタンパク質に働く分子間力を適切に計測できる実験系はこれまで皆無だった。

ヘリックス型膜タンパク質の構造安定性は、主に膜環境中でのヘリックス間相互作用によって保たれているが、この相互作用はヘリックス-ヘリックス間力のみならず、脂質-ヘリックス間力、脂質-脂質間力も含めた3つの力のバランスで決まる。またヘリックス-ヘリックス間力は全てのヘリックスが持つ basal な会合力と、会合を促進するアミノ酸配列 (会合モチーフ) による会合力に分離できる。これら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適切かつ有効である。しかし、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。

研究代表者らはこれまでに、脂質二分子膜系において、モデル膜貫通ヘリックス (LALAAAA)₃ や (AALALAA)₃ の会合の熱力学量 (G , H , S , C_p) を、蛍光励起エネルギー移動 (FRET) 測定から世界に先駆けて決定し、膜環境でヘリックスがヘリックスマクロ双極子間の引力に由来する basal な会合力を持ち、逆平行型二量体を形成すること [Biochemistry (2002) 41, 3073]、膜厚増大によるヘリックス末端誘電率の低下によりマクロ双極子間力が増強すること

[(2006) 45, 3370]、脂質フォスファチジルエタノールアミンが、間接的にヘリックス会合を促進することを明らかにしてきた。さらに近年、蛍光標識膜貫通ヘリックスを組み込んだリポソームの一分子 FRET 測定により、膜貫通ヘリックスの会合-解離をモニターする独自の実験系を確立し、コレステロール存在下で (AALALAA)₃ の会合が促進されること、ヘリックス単量体・二量体がそれぞれ数 10 ミリ秒オーダーの寿命を持つことを明らかにしている。これは二分子膜系で膜貫通ヘリックス会合ダイナミクスを検出した世界初の例であり、新たな膜タンパク質フォールディング研究手法としてきわめて有用だと考えられる。

本研究では、これら独自の計測手法を駆使し、膜貫通ヘリックス会合を促進するアミノ酸配列 (ヘリックス会合モチーフ) および脂質組成が膜貫通ヘリックス間相互作用に与える影響を計測する。ホスト配列 (AALALAA)₃ と、会合を促進するゲスト配列を導入したヘリックス間での会合力の差で会合モチーフの影響を定量する (ホスト-ゲストアプローチ)。

2. 研究の目的

本研究ではホスト配列 (AALALAA)₃ に対して、以下の会合モチーフを導入した際のヘリックス間相互作用揺らぎが脂質組成 (特にコレステロールの有無) にどのような影響を受けるか、主として蛍光一分子計測による測定を行い、脂質膜環境で脂質とヘリックス会合モチーフが分子間相互作用に与える影響を計測する。研究を迅速に進めるため、まず、これまでより高効率かつ、平行型・逆平行型 2 量体を区別できる一分子 FRET 計測用サンプル調製法を確立する。次に、会合モチーフとして、膜貫通ヘリックス間相互作用で頻出する、GXXXG 会合モチーフを導入した際のヘリックス会合-解離のダイナミクスに与える影響、脂質組成の影響を解明する。

また、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造が、4-ヘリックス bundle 形成の駆動力を持つのかどうか検討を行う。

これらの結果から、膜貫通ヘリックス間相互作用の熱力学量・遷移の活性化エネルギー

一の会合モチーフ・脂質依存性を解明し、膜タンパク質安定性に関して、例えば「会合モチーフ X は脂質 Y の存在下で 2 量体を安定化する (活性化エネルギー kJ mol^{-1}) 」などのような一般性のある法則を可能な限り多く見出すことを目指す。

3 . 研究の方法

各モチーフを導入した蛍光標識膜貫通ヘリックスを合成してリポソームに組み込み、主に一分子蛍光計測により会合-解離の動力学・熱力学を解析した。一分子 FRET 計測をこれまでよりも迅速、正確に行うために、ジスルフィド架橋を利用した、高効率かつ高効率かつ、平行型・逆平行型特異的会合検出法を確立した。

これまでの一分子 FRET 測定では、蛍光ドナー (Cy3B) 標識ヘリックスとアクセプター (Cy5) 標識ヘリックスを混合しリポソームに組み込んでいたため、ドナー標識体とアクセプター標識体が一つずつ含まれたリポソームだけを選別 (全リポソームの 3% 未満) し解析する必要があった。またこの方法では、逆平行型、平行型会合を直接区別できない。そこで、ドナー標識体とアクセプター標識体をジスルフィド結合で架橋し精製してリポソームに組み込んでから還元することで、相対的配向を制御した 2 量体を高効率で調製し一分子 FRET を行った。逆平行型会合の場合は、

Cy3B- β -C- β -AALALAA-AALALAA-AALALAA-NH₂
(1)

Cy5- β -AALALAA-AALALAA-AALALAA- β -C-NH₂
(2) を用いた (β は β -alanine) 。ペプチド (1) の Cys を DTNB で活性化して (2) と混合し、逆平行ヘテロ 2 量体を形成させた (Methods Mol. Biol. 283, 71-85, (2004)) 。平行型会合を見る場合は (2) の代わりに Cy5- β -C- β -AALALAA-AALALAA-AALALAA-NH₂
(3) を用いた。

ペプチドは Fmoc 固相合成法で合成した。精製は HPLC で行った (カラム : PLRP-s ; 溶媒 : ギ酸 / 水 (3/2, v/v) とギ酸 / イソプロパノール (4/1, v/v) のグラジエント ; 温度 : 50) 。精製したペプチドの分子量は、

MADLI-MS で確認した。

スライドガラスのコーティングおよびリポソームの結合は、Ha らの方法に従って行った (Selvin & Ha “ Single-molecule techniques ” pp3-35, (CSHL 2008)) 。リポソーム中に組み込んだヘテロ二量体の還元には 1 分子計測のプリンキング防止にも使われる β -メルカプトエタノールを用いた。

一分子蛍光測定は、全反射型蛍光顕微鏡 (ニコン) で行った。温度依存性を見るため 20-35 で測定した。会合・解離の速度定数の温度依存性から、会合の熱力学量・遷移の活性化エネルギーを決定した。脂質二分子膜中での膜貫通ヘリックス構造は偏光全反射赤外吸収スペクトルにより確認した。

GXXXG モチーフ導入時にも、同様の方法で平行型・逆平行型会合を計測した。Gly, Ala, Ser, Thr など側鎖の小さいアミノ酸は、膜貫通ヘリックス間コンタクトで頻繁に見られる (Biophys. J. (2002) 82, 2720) 。特に、グリシンジッパーモチーフ (GXXXG) は、膜貫通ヘリックス間会合を促進する最も典型的な配列モチーフだと考えられている (J.Mol.Biol. (2000) 296, 921) 。そこで、GXXXG モチーフを宿主配列に導入した膜貫通ヘリックス AALALAA-AGLALGA-AALALAA

の蛍光標識体を合成し、ヘリックス間会合相互作用揺らぎがどのような影響を受けるのか測定した。フォスファチジルコリン膜に、コレステロールを添加した時の影響を見た。

また、二回膜貫通型のペプチドとして、これまで用いてきた宿主配列 (AALALAA)₃ をループで繋いだ、(AALALAA)₃-GGGG-(AALALAA)₃ の N 末端 Cy3B、Cy5 標識体を合成した。合成法として、昆虫細胞由来の無細胞合成系 (transdirect insect cell, 島津) を用いる方法および、他のペプチドと同様の Fmoc 固相合成法の二種類を試みた。

単量体、二量体の寿命は HaMMy fitting (<http://bio.physics.illinois.edu/HaMMy.asp>) で求めた。

4 . 研究成果

ジスルフィド架橋膜貫通ヘリックスを用いたヘリックス会合トポロジーの制御について、ホスト配列(AALALAA)₃を平行型、または逆平行型でPOPC/cholesterol(7/3)リポソームに組み込み、還元後一分子FRET測定した所、逆平行型の場合のみFRET揺らぎが観測された(86%, $n = 28$)ことから、実際に会合トポロジーを制御できることが確かめられた。

GXXXGモチーフを導入したヘリックスを平行型でPOPCリポソームに組み込んだ場合には、ホストヘリックスでは見られなかったFRET揺らぎが観測され、モチーフによってヘリックス会合が促進していることがわかった。またホストの逆平行型会合を駆動することがわかっているコレステロール添加によって、GXXXGヘリックスの会合は抑制され、一分子FRET観測条件では全く会合が見られなくなることが明らかになった。このような明確な脂質依存性は、GXXXGモチーフを持つ一回膜貫通タンパク質グリコホリンAでの報告例と一貫している。コレステロールによる会合抑制の可能性として、GXXXGモチーフにコレステロールが結合しヘリックス間相互作用を妨げている可能性が考えられた。しかし、蛍光ステロールであるデヒドロエルゴステロールと膜貫通ヘリックス間で特異的結合が見られなかったことから、別の理由で会合抑制していると考えられた。また、GXXXGモチーフはPOPC中で逆平行型会合も駆動する事がわかった。

ヘリックス会合体の構造について、アミノ酸特異的に安定同位体で標識した膜貫通ヘリックスの偏光全反射赤外吸収スペクトルを測定した。中心の7残基(A8, G9, L10, A11, L12, G13, A14)をそれぞれ標識したヘリックスのアミドI'の吸収の二色比から、ヘリックス主軸の膜に対する配向は5°程度とほぼ垂直に配向している事がわかった。赤外吸収スペクトルは高濃度(2mol%)のペプチド濃度で行ったが、アミノ酸配列からヘリックス会合面を予測するPREDDIMERプログラムでも測定結果と一貫したヘリックス会合インターフェースが予測された事から、一分子計測条件でも同様

の平行型会合体を形成していると考えられた。GXXXG導入ヘリックスでは、ホストヘリックスにはない、2つのGと4つのAを含む会合インターフェースが存在すると考えられる。コレステロール、GXXXGはともに砂時計型のヘリックス2量体を安定化させると予想されるが、今回のGXXXGヘリックスではなぜこのような構造が見られなかったのか今後引き続き調査する必要がある。

一分子FRET解析および、以前のアンサンブルFRET測定の結果から推測されるGXXXGモチーフの会合への寄与は、 -20 kJ mol^{-1} 程度であり、グリコホリンA会合におけるGly変異体の寄与と同程度であることがわかった。GXXXGヘリックス二量体のPOPC中での解離速度は $k_{\text{off}} = 3-7 \text{ s}^{-1}$ 程度であったが、同程度の会合自由エネルギーを持つ水溶性コイルドコイルでも同程度の解離速度が報告されていることから、側方拡散が水中よりも遅い膜分子においても、ダイナミックなヘリックス会合-解離過程が存在しうることが明らかになった。Gly残基は単独では膜に分配できる疎水性を持たないため、膜中で脂質を避けるように相互作用する可能性がある。

これらの結果は、small-residue motifが膜タンパク質の素早いコンフォメーション変化や、過渡的なヘリックス間相互作用に有用であることを示している。

二回膜貫通ヘリックスに関して、無細胞合成系では全長のペプチドが得られなかった。一方Fmoc固相合成法で、(AALALAA)₃-GGGG-(AALALAA)₃の合成・生成が可能になり、Cy3B、Cy5標識体をランダムにリポソームに組み込み二量体化を一分子計測した。結果、二回膜貫通ヘリックス同士は一回膜貫通ヘリックス同士よりも強く会合し、会合-解離のダイナミクスは二回膜貫通ヘリックスで遅くなる事が明らかになった。これは膜貫通ヘリックス会合ダイナミクスのサイズ依存性を測定した最初の例であり、膜内のsmall-residueを介したヘリックス会合一般に適用できる可能性がある。

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1件)

1) Yano Y., Kondo K., Kitani R., Yamamoto A., Matsuzaki K. Cholesterol-induced lipophobic interaction between transmembrane helices using ensemble and single-molecule fluorescence resonance energy transfer. **Biochemistry** 54, 1371-1379 (2015) (査読有)

[学会発表](計6件)

- 1) 渡邊由宇太、近藤小太郎、矢野義明、松崎勝巳. 二回膜貫通ヘリックス間相互作用の一分子蛍光測定に用いるモデルペプチドの合成. 日本薬学会第136年会. 2016年3月26日~2016年3月29日. パシフィコ横浜(神奈川県)
- 2) 矢野義明. ペプチドを用いた膜蛋白質の構造形成駆動力計測とイマーシング解析. 蛋白質研究所セミナー mechanism of biology on the membrane. 2016年3月04日~2016年3月04日. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)
- 3) Yoshiaki Yano, Kotaro Kondo, Katsumi Matsuzaki, Single-molecule FRET detection of GXXXG-mediated transmembrane helical interactions., Biophysical society 59th annual meeting. 2015年02月07日~2015年02月11日. Baltimore, MI, USA
- 4) 近藤小太郎、矢野義明、松崎勝巳一分子 FRET 測定法を用いた膜貫通ヘリックス間相相互作用への GXXXG モチーフの寄与の解明. 第52回日本生物物理学会. 2014年9月25日~2014年9月27日. 札幌コンベンションセンター(北海道)
- 5) 近藤小太郎、矢野義明、松崎勝巳一分子 FRET 測定法を用いた膜貫通ヘリックス間相相互作用への GXXXG モチーフの寄与の解明. 第12回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム. 2014年7月14日~2014年7月15日. 箱根高原ホテル(神奈川県)
- 6) Yoshiaki Yano, Kotaro Kondo, Ryota Kitani, Katsumi Matsuzaki, Single-molecule detection of association-dissociation dynamics of transmembrane helices induced by cholesterol., 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium. 2013年11月6日~2013年11月08日. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学
分野のホームページ
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野義明 (YOSHIAKI YANO)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号: 60402799

(2) 連携研究者

松崎勝巳 (KATSUMI MATSUZAKI)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 00201733