

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650015

研究課題名(和文)1回膜貫通型蛋白質を一方向でリポソーム上に存在させる技術の開発

研究課題名(英文)Developing strategy for uni-directional insertion of single transmembrane protein to liposome

研究代表者

佐藤 毅 (Sato, Takeshi)

大阪大学・たんぱく質研究所・講師

研究者番号：90403013

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 1回膜貫通型タンパク質、または膜貫通ペプチドの脂質二重膜中での構造生物化学的解析を行う上で、その挿入方向がしばしば問題となる。本研究においては、膜貫通ペプチドをリポソームに対して一定方向で挿入する技術の開発を中心に、膜タンパク質、膜貫通ペプチドの脂質二重膜への再構成法を見直すこととした。細胞の大きさと類似の大きさのリポソームへのペプチドの挿入に関しては、膜貫通配列のC末側に膜透過配列を導入したペプチドを試料とした。この試料は、数十分の間はリポソーム膜上に留まるが、後に内部へと移行してしまうことが分かった。一方、再構成法の見直しにおいては、大きな時間短縮を可能とする条件を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文): Structural studies on the transmembrane region of membrane protein should be done in lipid bilayers. Direction of the transmembrane peptide insertion to the membrane often provides a problem. In this project, uni-directional insertion of a transmembrane peptide to liposome was examined. The peptide was designed to have a cell penetrating sequence in the C-terminus of the transmembrane sequence. This peptide was found to exist on the surface of the liposome. However, a longer 20-30 min of incubation, the peptide passed through the membrane. Additional techniques are required to achieve the goal. Another trial for obtaining better conditions for the reconstitution has been successful. The protocol enabled more rapid reconstitution than the general ones that have been used.

研究分野：構造生物化学

キーワード：膜タンパク質 再構成

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は膜の内と外を仕切る役割のほか、情報伝達、物質の輸送等の機能を有する。それら生体膜上の事象において、タンパク質は中心的役割を担っている。そのタンパク質の機能を理解していくことは生体膜上における事象の分子機構の解明、さらにはその制御を達成し、そこから始まる創薬的研究等の応用研究への発展に必須である。また、そのような発展を目指す上で、タンパク質の構造と機能の相関解析が果たす役割は大きい。膜タンパク質の構造解析研究で報告された構造がその膜上での biology を反映しているのか、このような問題を念頭におきながら、それら構造を基盤とした機能解析が行われる。

構造と機能の相関解析を再考すると、そのベースは実際に機能している分子の構造変化を高分解能で捉えることになるはずである。その究極的手法は細胞における (in vivo) 解析であり、そのような観点では in cell NMR は有効な方法である。しかし、膜タンパク質を標的とした解析を考えると高等細胞を用いた実験が可能かどうかは现阶段では疑問である (測定試料タンパク質の濃度、運動性、または測定感度等を自由に操るには、さらなる開発が必要であると感している)。従って、人工的な系 (本申請書では再構成系と呼ぶ) を用いての研究を行っていくこととなるが、このような系を用いる上での大きな挑戦は、試料とするタンパク質を最大限機能させることである。受容体型チロシンキナーゼを例に挙げれば、細胞外領域におけるリガンド結合能、膜貫通部位における構造変化を可能とする脂質組成、細胞質内領域におけるキナーゼ活性等、それぞれ異なる環境に存在している領域が連動し、一つの受容体として最大限機能するための条件を見出さなければならない。高効率な機能の再現は注目しているタンパク質が一様に活性型構造を呈する結果であると考えれば、高分解能構造解析を達成する上でも重要となる。

### 2. 研究の目的

最近、膜タンパク質の構造解析、特に溶液 NMR ではバイセルやナノディスク等の可溶化を第一目的とした脂質二重膜系が用いられるが、今後、再構成系において膜タンパク質の機能も合わせて注目していくためには、膜の内と外、個別の環境を作り出すことが可能な実験系、つまりリポソームを用いた研究も必要となる。リポソームの可溶性が問題となる可能性があるが、試料の可溶化を前提としない固体 NMR による解析を想定すれば、むしろ、その低分解能、低感度を克服する方法を捻出すことに力点を置くべきである。再構成系は、膜組成等の膜タンパク質の存在環境を自由自在にデザインできるという点において優れた実験系であり、構造と機能の相関解析においては詳細な情報を与える。一方で再構成系においてリポソームを用いた

場合の問題点は、試料タンパク質の挿入方向が一様にならないところであり、その結果試料の機能を最大限引き出すことができない。先の受容体を例とすれば、リポソームの外からリガンドの結合を試みた場合、それが結合するのは細胞外領域がリポソームの外側に存在するもののみである。本研究では、この問題点に絞って、膜タンパク質の構造と機能の相関解析手法の基礎技術の開発を行う。すなわち、細胞の大きさに近いリポソーム表面において膜タンパク質の方向を揃えて存在させる技術開発を行う。将来、固体 NMR による膜タンパク質の構造解析を見据えた基礎技術の開発である。

### 3. 研究の方法

図1にリポソーム表面において1回膜貫通型膜タンパク質の方向を揃えて存在させる技術戦略について模式的に示し、まず、その全体像を説明する。

細胞の大きさに近い直径が 10-15  $\mu\text{m}$  のリポソームを調製しておく。このリポソームには、膜内環境に存在させることを想定したタンパク質断片等を封入しておく。それらのタンパク質断片等は膜貫通部位を有するタンパク質断片と protein ligation で反応させるため、必要な官能基を有するものとする。本申請研究では、膜貫通配列の C 末端側をリポソーム内部に位置させることを目指す。すなわち、図に示すように protein ligation によって、リポソーム内のタンパク質断片と反応させることを想定し膜貫通部位の C 末端側にチオエステルを導入しておく。

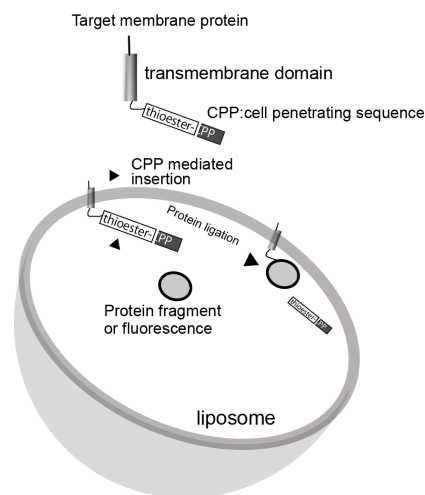


図1 本研究の概念図

膜貫通部位を有するペプチドの脂質二重膜への挿入方向を決定するのは膜透過性配列 (CPS) である。本研究において、膜透過性配列は、まず非常に多くの研究がなされている HIV-1 の TAT (transactivator of transcription) 由来の配列 (RKKRRQRRR) を用いることとする。CPS の配列は目的に応じ

て、検討していくこととする。CPS 配列はペプチドチオエステルの C 末端側に存在するため、protein ligation 反応の後には、膜貫通部位からは切り離される。

リポソームの調製：共同研究者である Surajit Ghosh (Indian Institute of Chemical Biology, Kolkata, India) らが用いているリポソーム調製法を参考とする (図 2; Saha et al. ChemComm 2013)。簡単にリポソーム作成に関して述べる。まず、ミネラルオイル中に、リポソーム内部に封入する緩衝液等を lipid-coated water droplet として作成する (図 2b; w/o emulsion)。その droplet を油/水 (リポソーム外部の緩衝液となる) の二相分離した液体中に流し込むことでリポソームが調製できる

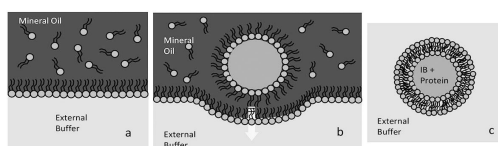


図 2 リポソーム調製概念図

元々は "w/o emulsion transfer method" または "inverted-emulsion method" と呼ばれ、Pautot らによって開発されたリポソームの調製法 (Pautot Langmuir 2003) であり、膜融合、マガイニンによる pore の形成等、様々な研究に用いられている (for review, Walde et al ChemBioChem 2010)。非常に簡単な方法で直径が 10 μm 以上の大きなリポソームが調製可能であること、または短時間ではあるが、非対称な脂質二重膜組成状態における実験も可能であるという報告もある (Hamada et al. J.Phys.Chem B, 2008)。

膜貫通ペプチドの脂質二重膜への挿入実験：最初のターゲットは、グリコホリン A の膜貫通部位 [GpA(70-98)] とし、図 3 に示すペプチド誘導体を合成し、リポソームとの相互作用を蛍光顕微鏡で見えていくこととした。今回は蛍光物質として FITC を用いることとした。

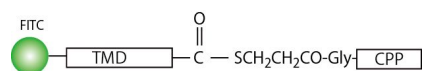


図 3 本実験で用いたペプチドのデザイン。  
TMD;膜貫通部位; CPP: 膜透過配列; FITC: fluorescein isothiocyanate

#### 4. 研究成果

リポソームとペプチドの相互作用観察  
脂質混合物 (Egg-PC, DOPS, POPG より構成される) に TRITC-DHPE (DHPE にテトラメチルローダミンを導入した脂質誘導体) を加えるこ

とで、表面も蛍光標識したリポソームを作成し、FITC 標識したペプチドとの相互作用を confocal 蛍光顕微鏡で画像を捉えていくこととした。まず、ペプチドを加えた直後の画像を示す (図 4)。

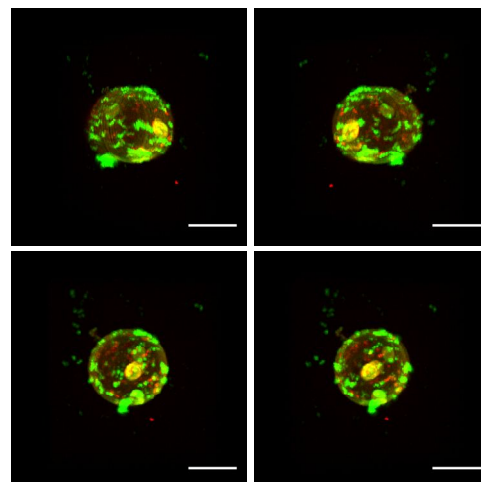
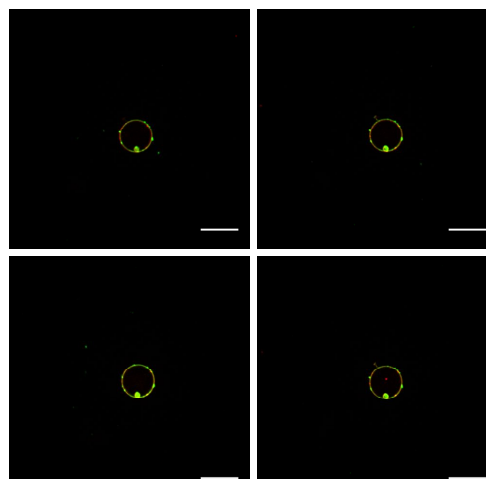


図 4 リポソーム懸濁液にペプチドを加えた直後の画像。棒線の長さは 20 μm に相当する。

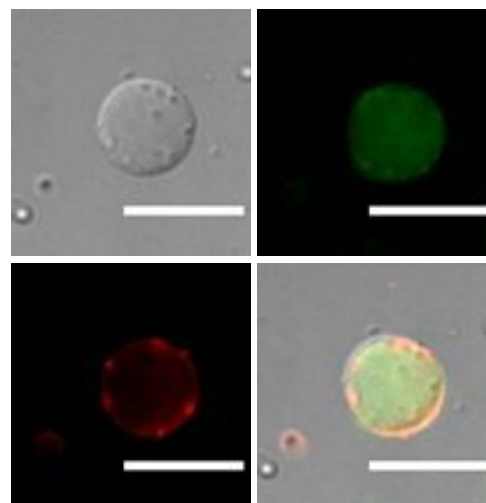


図 5 ペプチドを加えて 60 分後の画像。

図 4 から明らかな通り、GpA ペプチドはリポソーム表面に結合した。この状態は約 30 分程度続いた。しかし、別の試料において、GpA ペプチドを加え、さらに長時間 incubate した後の画像では (図 5) では、ペプチドがリポソームの中に入っていきことが観察された。現在も、実験は進行中であり、ペプチドを加える時の温度、脂質組成等を変化させて、測定を行っている。しかし、良好な結果を得るには至っていない。

膜貫通ペプチドの脂質二重膜への挿入法の開発。

従来の膜貫通ペプチドの脂質二重膜への挿入法に改善を加えることに成功したので報告する。

膜貫通ペプチドの脂質二重膜中における挙動解析を行う上で、当該ペプチドの脂質二重膜への挿入は重要なステップとなる。一般的には、ペプチド、脂質をクロロホルムとアルコールに溶解させ、有機溶媒を減圧下において除去の後、水和を行うことで解析試料とする。困難な作業ではないが、有機溶媒の除去が不十分である場合は、再現性のある結果が得られない。また、有機溶媒の完全な除去は一般的には一晩という時間を有する。また、構造解析実験においては、再現性の高い結果を与える detergent dialysis 法という方法があるが、この手法においては、界面活性剤を除去するための透析に数日を要する、さらに、透析時にペプチドを失うという問題点が存在する。筆者は、クロロホルムの代わりにシクロヘキサンを用いることで、短時間でのペプチド挿入、再現性の向上が可能であることを見出した。

膜貫通ペプチド、脂質をシクロヘキサンと hexafluoroisopropyl alcohol (HFIP) の混合溶媒に溶かし、有機溶媒は凍結乾燥によって除去、水和を行うことによって解析試料とした。シクロヘキサンをを用いることで、凍結乾燥による有機溶媒の除去が可能となった。この条件を用いることで、有機溶媒の十分な除去を短時間 (20 分程度) で達成できる。従って、膜貫通ペプチドの脂質二重膜への挿入、すなわち、再構成に要する時間は数時間程度となり、大きな時間短縮となる。

当シクロヘキサンを用いた再構成法を用いることで、膜貫通ペプチドを脂質二重膜に包埋し、偏光 FT-IR によってその脂質二重膜に対する配向を評価した。ペプチドは 2014 年 *Biochemistry* 誌に報告した研究で用いた線維芽細胞増殖因子受容体の膜貫通配列由来のものとし、比較対象は同論文中に報告した detergent dialysis 法によって再構成をして試料由来の値 (脂質二重膜の法線に対するヘリックスの角度) とした。図 6 に偏光 FT-IR のスペクトルを示す。スペクトルによって得られる配向係数は、上記論文にて報告した値と同様、膜貫通ヘリックスの脂質二重膜法線に対する角度は約 30° であることが

示された。この試料のみならず、他の配列ペプチドにおいても、再現性は良好であり、本手法は、今後の膜貫通ペプチドの脂質二重膜への再構成法としては有効であることが示せたと考えている。

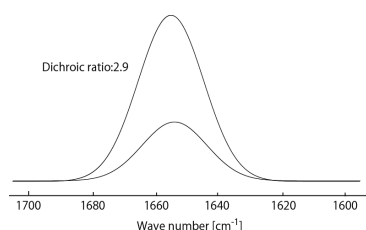


図 6 FGFR 膜貫通領域の脂質二重膜における配向を示す偏光 FT-IR スペクトル(波形分離後)。強度の大きなもの、小さなものがそれぞれ脂質二重膜に対して垂直、平行方向の光を当てた時の吸収に対応する。それらの面積比から、膜貫通ヘリックスの配向を算出した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Emilie Leroy, Jean-Philippe Defour, Takeshi Sato, Sharmila Dass, Vitalina Gryshkova, Shwe Myat Marlar, Judith Staerk, Stefan N. Constantinescu and Steven O. Smith. His499 Regulates Dimerization and Prevents Oncogenic Activation by Asparagine Mutations of the Human Thrombopoietin Receptor. *J. Biol. Chem.* 291, 2974-2987 doi: 10.1074/jbc.M115.696534

Takeshi Sato. Synthetic transmembrane-juxtamembrane peptide for the structure and function of ErbB receptor tyrosine kinase. *Biopolymers Peptide Science*. doi: 10.1002/bip.22775 In press.

Shizuka Takagi-Niidome, Tomoki Sasaki, Satoko Osawa, Takeshi Sato, Kanan Morishima, Tetsuo Cai, Takeshi Iwatsubo, and Taisuke Tomita\*. Cooperative roles of hydrophilic loop 1 and the C terminus of presenilin 1 in the substrate-gating mechanism of  $\gamma$ -secretase. *J. Neurosci.* 35, 2646-2656, 2015 doi: 10.1523/JNEUROSCI

Tadamasa Arai, Daisuke Sasaki, Takushi Araya, Takeshi Sato, Youhei Sohma\* and Motomu Kanai\*. A Cyclic KLVFF-Derived Peptide Aggregation Inhibitor Induces the Formation of Less Toxic Off-Pathway Amyloid-Oligomers. *ChemBioChem* 17, 2577-83, 2014 doi: 10.1002/cbic.201402430

Hiroko Tamagaki, Yusuke Furukawa, Ritsuko Yamaguchi, Hironobu Hojo, Saburo

Aimoto, Steven O. Smith and Takeshi Sato. Coupling of transmembrane helix orientation to membrane release of the juxtamembrane region in FGFR3. *Biochemistry* 53, 5000-5007, 2014 doi: 10.1021/bi500327q

Tadamasa Arai, Takushi Araya, Daisuke Sasaki, Atsuhiko Taniguchi, Takeshi Sato, Youhei Sohma\* and Motomu Kanai\*. Rational Design and Identification of Non-Peptidic Aggregation Inhibitor of Amyloid- Based on a Pharmacophore Motif Obtained from cyclo[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-]. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8236-8239, 2014 doi: 10.1002/anie.201405109

Hiroko Tamagaki, Ritsuko Yamaguchi and Takeshi Sato. Structural Characterization of the Transmembrane-Intracellular Juxtamembrane Region of FGFR3 and Its Implication in the Activation Mechanism. *Peptide Science* 2013, 59-60, 2014

Abhijit Saha, Goutam Mondal, Takeshi Sato and Surajit Ghosh. In vitro reconstitution of a cellular like environment using liposome for A peptide aggregation, its propagation, peptide-lipid interaction and drug screening. *Peptide Science* 2013, 109-110, 2014

佐藤 毅 ペプチド化学を基礎とした受容体型チロシンキナーゼ膜貫通-膜近傍部位の構造解析. *化学工業* Vol.65, NO.11, 15-21, 2014

佐藤 毅 受容体型チロシンキナーゼにおける膜を介した情報伝達のしくみ. *生物物理* 313号, 5月25日, 2014

Chihiro Matsushita, Hiroko Tamagaki, Yudai Miyazawa, Saburo Aimoto, Steven O. Smith\* and Takeshi Sato. Transmembrane helix orientation influences membrane binding of the intracellular juxtamembrane domain in Neu receptor peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 110, 1646-1651, 2013 doi: 10.1073/pnas.1215207110

Jean-Philippe Defour, Miki Itaya, Vitalina Gryshkova, Ian C. Brett, Christian Pecquet, Takeshi Sato, Steven O. Smith and Stefan N. Constantinescu. A Tryptophan at the Transmembrane-Cytosolic Junction Modulates Thrombopoietin Receptor Dimerization and Activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 110, 2540-2545,

2013 doi: 10.1073/pnas.1211560110

[学会発表](計 11 件)

佐藤 毅. 受容体型チロシンキナーゼの膜貫通 膜近傍部位の構造機能解析. 蛋白質研セミナー. 2016年3月3日.

Takeshi Sato, Research on structure and function of membrane protein using synthetic transmembrane peptides, 19th Korean Peptide Protein Symposium, Choongchungnam, South Korea, July 7-8, 2015

佐藤 毅, 合成ペプチドを用いた1回膜貫通型タンパク質の構造機能解析, 第15回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「生体膜上における事象の分子機構解明を目指すペプチド生命科学」, 徳島, 2015年6月26日.

Takeshi Sato, Mechanism for signaling through the membrane in activation of receptor tyrosine kinase; Molecular Targets for Diseases and Structural Life Science, The 9th International Symposium of the Institute Network; Organized by IPR and RIMD, Osaka University; Osaka, Japan, June 19-20, 2014

佐藤 毅, 合成ペプチドを用いた膜タンパク質の構造生物学, 横浜国立大学工学研究院リサーチフォーラム, 横浜, 2015年1月27日.

佐藤 毅, EGFR 膜貫通-膜近傍部位の構造機能解析, 第87回日本生化学会, 京都 2014年10月15日; フォーラム「次世代脂質生物学を支える革新的テクノロジー」.

佐藤 毅, ペプチド化学を基盤とした受容体チロシンキナーゼ膜貫通-膜近傍部位の構造機能解析, 生命分子機能研究会セミナー-2014年3月14日.

Hiroko Tamagaki, Ritsuko Yamaguchi and Takeshi Sato. Structural Characterization of the Transmembrane-Intracellular Juxtamembrane Region of FGFR3 and Its Implication in the Activation Mechanism. 第50回日本ペプチド討論会, 大阪, 2013年11月6日 8日.

Abhijit Saha, Goutam Mondal, Takeshi Sato and Surajit Ghosh. In vitro reconstitution of a cellular like environment using liposome for A peptide aggregation, its propagation, peptide-lipid interaction and drug screening. *Peptide Science* 2013, 109-110,

2014

Takeshi Sato, Structural change in the transmembrane-juxtamembrane region of receptor tyrosine kinase for its activation ; Membrane Protein Folding organized by the Biophysical Society (US) and the Korean Institute for Advanced Study; Seoul, South Korea, May 19-22, 2013

Takeshi Sato, Structural biology on membrane protein using synthetic transmembrane peptides; 4th Indian Peptide Symposium, Kolkata, India, February 22-23, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Takeshi)

大阪大学蛋白質研究所・講師

研究者番号：90403013