

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291031

研究課題名(和文) パターン化人工膜を用いた膜タンパク質のラフト親和性と機能の解析

研究課題名(英文) Evaluating the raftophilicity of membrane proteins in a patterned model membrane

研究代表者

森垣 憲一 (Morigaki, Kenichi)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：10358179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜においてコレステロールと飽和脂質に富んだ膜ドメイン(ラフト)は、膜タンパク質の局在や機能調節に大きな役割を果たすと考えられている。本研究は、ラフト領域(Lo相)と非ラフト領域(Ld相)が明確なパターンとして形成された人工膜を用いて、ラフトの役割を定量的に評価する手法を開発した。ロドプシン光受容体および光シグナル伝達に関する膜結合型タンパク質群をモデル膜タンパク質として用いて、人工膜への再構成技術、ラフト親和性定量化技術を確立した。その結果、光活性化されたロドプシンがラフト親和性を高めることが示された。これは、ラフトによるシグナル伝達機能調節機構を初めて定量的に評価した重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Lipid rafts in the cell membrane are believed to affect various membrane functions, including the signaling by G protein coupled receptors (GPCRs). However, the regulatory roles of lipid rafts on membrane functions are still poorly understood, partially owing to the lack of the methods to quantitatively evaluate the affinity of membrane proteins to lipid raft (raftophilicity). We developed a new methodology to gauge the raftophilicity of membrane proteins by using a patterned model membrane that has patterned liquid ordered (Lo) and liquid disordered (Ld) bilayers. We reconstituted membrane proteins including rhodopsin (Rh) and determined their raftophilicities. We found that the raftophilicity of Rh was heightened upon photo-activation, suggesting the functional roles of lipid rafts. Patterned model membrane offers a robust and scalable platform for systematically and quantitatively studying the functional roles of lipid rafts in biological membranes including retinal disc membranes.

研究分野：生物物理

キーワード：生体膜 膜タンパク質 脂質ラフト 人工膜

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は極めて複雑で動的な構造を持っている。特に、コレステロールと飽和脂質に富んだ膜ドメイン(ラフト)は、膜タンパク質の局在や機能調節に大きな役割を果たすと考えられている(Simons, Nature 387: 569 (1997))。しかし、ラフトが膜機能に果たす役割は未解明である。細胞膜で多様な信号を受容する G タンパク質共役型受容体(GPCR)も、その機能にラフトが関わると考えられている(Zheng, BMC Cell Biol 13: 6 (2012))。しかし、ラフトの微小さと動的変化が GPCR のラフトとの相互作用や機能調節メカニズムの検証を困難にしている。

このような状況の中で、研究代表者は、生体膜のモデル系として、ガラス基板に安定なポリマー脂質膜を作製し、生体膜の特性を保持した生体脂質膜とハイブリッド化したパターン化人工膜を作製する技術を独自に開発し(Angew. Chem. Int. Ed. 40: 172 (2001))。生体膜のラフト領域(秩序液晶相: lo 相)と非ラフト領域(無秩序液晶相: ld 相)をパターン化する技術を確立した(Langmuir. 26: 4126 (2010))。

### 2. 研究の目的

本研究は、ラフト領域(lo 相)と非ラフト領域(ld 相)が明確なパターンとして形成された人工膜を用いて、ラフトの役割を定量的に評価する手法を開発した。細胞膜の微小ドメイン構造(ラフト)は、膜タンパク質の機能調節に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、膜タンパク質とラフトとの相互作用が膜タンパク質機能に与える影響を生きた細胞で定量的に評価することは極めて難しい。本研究は、ラフト領域と非ラフト領域への膜タンパク質分配や、両領域における膜タンパク質の機能を測定することによって、ラフトが膜タンパク質の局在と機能をどのように調節するかを定量的に評価する新しい方法論を確立しすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) パターン化人工膜の作製

ガラス基板にパターン化人工膜を作製した。光重合性リン脂質(DiynePC)二分子膜を基板表面に累積し、UV 重合することで安定なポリマー脂質膜を作製した。モノマーを除去した部位に生体膜由来の脂質膜をベシクル融合法で導入した。光リソグラフィ技術でポリマー膜量を調節することで、(a)流動性脂質膜(100%生体脂質)、(b)部分重合膜(生体脂質とポリマー脂質の混合膜)、(c)ポリマー脂質膜の3領域を作製した。

#### (2) パターン化人工膜への膜タンパク質の再構成

GPCR のモデル分子として、構造・機能解析が

最も進んだロドプシン光受容体(Rh)を用いた。また、光シグナル伝達に關与する膜結合型タンパク質群(G タンパク質トランスデュースイン(Gt)、ロドプシンキナーゼ 1(GRK1)、フォスホジエステラーゼ 6(PDE6)など)もパターン化人工膜に再構成し、ラフト親和性を定量した。タンパク質の調製は、ウシガエル(Rana catesbeiana)桿体外節に存在する円板膜を用いて行った。人工膜への再構成は、基板表面にあらかじめ脂質膜を形成しておき、界面活性剤で可溶化した Rh を加えて膜内に Rh を導入した。Rh は、蛍光標識された Rh もしくは C 末端に特異的な Fab 抗体を用いて可視化した。また、Rh 二量体、光活性化 Rh (Rh\*) Gt 複合体を円板膜表面で形成してから精製し人工膜に再構成した。

#### (3) 膜タンパク質のラフト親和性測定

再構成された膜タンパク質のラフト親和性は、パターン化人工膜における Lo 相・Ld 相への分配から評価した。流動性膜部位には lo 相、部分重合膜部位には Ld 相が存在するので、それぞれの領域での分子密度を全反射照明による蛍光 1 分子観察により測定した。ラフト親和性は、Lo 相・Ld 相における分子密度から、次のように定義した。

$$P = D(\text{Lo}) / [D(\text{Lo}) + D(\text{Ld})]$$

(P: 分配率; D(Lo): Lo 相における分子密度、D(Ld): Ld 相における分子密度)

### 4. 研究成果

#### (1) Rh および光シグナル伝達に關与する膜タンパク質群の再構成

パターン化人工膜に、Rh および光シグナル伝達に關与する膜タンパク質群を再構成する技術を開発した。Gt は三量体 G タンパク質であり脂質修飾がされている。水溶液中加入された Gt は膜に結合し膜表面で側方拡散することが 1 分子蛍光顕微鏡観察より示された。図 1 は、Gt の軌跡(黄色い線)と脂質膜蛍光(Ld 相に特異的に分布する TR-PE)を示したものである。TR-PE 蛍光が見られる部位、および見られない部位(円形)には、Lo 相・Ld 相が濃縮されており、両相の間を自由拡散していることが分かる。一方、Rh は 7 回膜貫通型タンパク質であるため、界面活性剤で可溶化された状態のタンパク質を水溶液に加えて、界面活性剤濃度を急速に低下させることで膜への組み込みを行った。再構成を行う際のセル形態、タンパク質(Rh)、脂質、界面活性剤の濃度(および相対比)、溶液攪拌、などの実験条件を最適化することで、Rh 分子の凝集を防ぎ膜に再構成する条件を確立した。図 1 に示されるように、Rh が Lo 相・Ld 相を自由拡散することが観察された。他の膜結合型タンパク質(PDE6, GRK1 など)についても同様の手法でパターン化人工膜

に再構成し、1分子蛍光観察することに成功した。

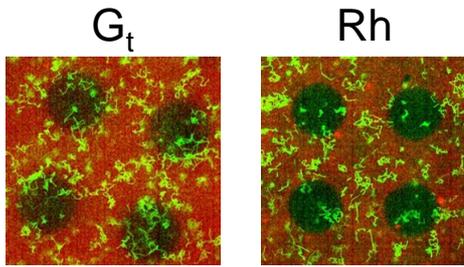


図1: パターン化人工膜に再構成された Gt および Rh の 1 分子蛍光観察画像。Gt, Rh 軌跡 (黄色い線) および脂質膜 (Ld 相に特異的に分布する TR-PE) が示されている。円形区画のサイズは  $4 \mu\text{m}$ 。

(2) 再構成された Rh の光受容機能  
再構成された Rh の膜内における拡散速度を、1分子蛍光軌跡の Mean square displacement (MSD) により解析することで評価した。Rh の拡散速度は、膜の脂質組成 (DOPC もしくは DOPC/ DPPC/ ChoI) によって大きく変化した。また、再構成された Rh が本来の光受容機能を保持していることは、Rh と Gt を同時に再構成して、光照射に伴う Rh と Gt との結合 (Gt 拡散速度の低下) および GTP 添加に伴う Gt の Rh からの脱離 (Gt 拡散速度の大幅な上昇) を観察することから示された (図2)。一般に基板表面に吸着した脂質膜に膜貫通型タンパク質を組み込むことは難しいとされる。従って、本研究で GPCR の一種である Rh を、側方拡散、機能を保持してパターン化脂質膜に組み込めたことは極めて重要な成果であると言える。この成果は、2015年に Biophysical Journal 誌に発表した (主な発表論文(5))

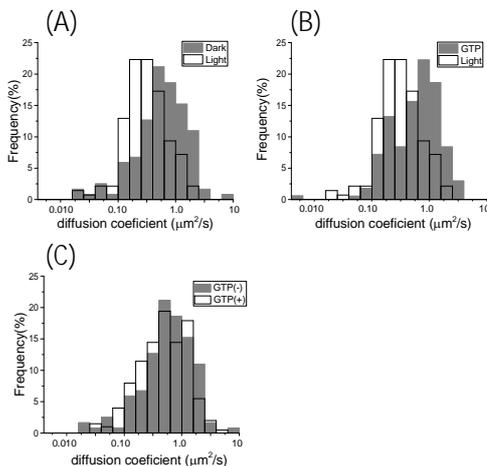


図2: パターン化人工膜に Gt と Rh を再構成して Gt の拡散速度を測定した。(A) 光照射による変化、(B) 光照射および GTP 添加による変化、(C) 光照射なしで GTP 添加した際の変化。

(3) Rh および光シグナル伝達関連分子のラフト親和性

Rh および光シグナル伝達関連分子のラフト親和性は、パターン化人工膜における Lo 相・Ld 相への分配から評価した。Rh 単量体、Rh 二量体、Rh\*-Gt 複合体のラフト親和性は、0.19, 0.62, 0.41 であった (図3)。二量体および光活性化された Rh (Rh\*) と Gt の複合体が高いラフト親和性を持つことは、ラフトの機能的役割を示唆する極めて重要な結果である。光を受容した Rh\* と Gt の複合体が高いラフト親和性を持つことはこれまでに生化学的に示されている (J. Biol. Chem. 276: 20813, (2001)) が、定量的な評価は初めてである。

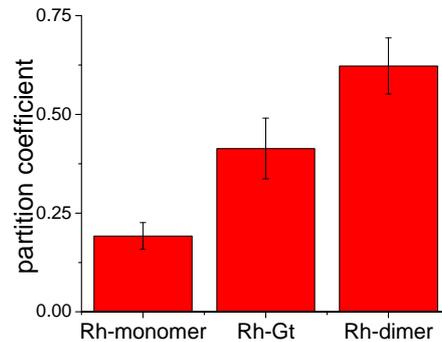


図3: Rh 単量体、Rh 二量体、Rh\*-Gt 複合体のラフト親和性。

また、Gt、Gt-サブユニット (G t)、PDE6 のラフト親和性は 0.27, 0.19, 0.03 であった。これらの結果は、PDE6 が円板膜において非ラフト領域 (辺縁部) に局在すること、光活性化した Rh に結合して GTP により脱離した G t が辺縁部に移行するという観察結果と一致している。さらに、活性化された Rh をリン酸化して光シグナル伝達を負に調節する GRK1 も比較的低いラフト親和性を持つことが明らかになった (0.16)。この結果は、光活性化されたロドプシンがラフトに局在することで、リン酸化効率が下がり、結果としてシグナル増幅効率が增大することを示唆している。

現在は、円板膜を用いた計測、および反応速度モデルを用いた in silico 解析を行って、人工膜で得られたラフトによる機能調節機構を実証しようとしている。この効果が証明されれば、ラフトによるシグナル伝達機能調節機構を初めて定量的に評価した重要な成果になるものと考えられる。

(4) GPCR および GPI-アンカー型膜タンパク質 (GPI-AP) の再構成とラフト親和性評価  
ロドプシンと光シグナル伝達関連タンパク

質分子以外にも、細胞内で多様な機能を司る GPCR と GPI-AP についてラフト親和性を定量する技術の開発を行った。GPI-AP については、蛍光タンパク質 (GFP) GPI アンカーとを結合しキメラ分子を作製し、細胞発現、精製、再構成する技術を確立した。また、GPCR としては、ドーパミン受容体をモデル分子とした検討を進めた。これらの分子は、ロドプシンなどに比べて得られるサンプル量が小さいため、従来の界面活性剤に可溶化した状態ではなく、より効率的に膜タンパク質を再構成することが重要であることが分かった。この点を踏まえて、現在、本研究の後継研究課題(基盤研究 B (一般))において、大量発現・精製が難しい哺乳類膜タンパク質の再構成およびラフト親和性定量化技術の開発を進めている。

## 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 15 件)

(1) Kinoshita, M., Suzuki, K. G. N., Matsumori, N., Takada, M., Ano, H., Morigaki, K., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T., Hirose, K. M., Fujiwara, T., Kusumi, A., Murata, M. "Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs", *J. Cell Biol.* **216** (4), 1183-1204, (2017) 査読有

DOI: 10.1083/jcb.201607086

(2) Nomura, K., Tanimoto, Y., Hayashi, F., Harada, E., Shan, X.-Y., Shionyu, M., Hijikata, A., Shirai, T., Morigaki, K., Shimamoto, K. "The role of the Prod1 membrane anchor in newt limb regeneration", *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (1), 270-274, (2017) 査読有

DOI: 10.1002/anie.201609703

(3) Ando, K., Tanabe, M., Morigaki, K. "Nanometric gap structure with fluid lipid bilayer for the selective transport and detection of biological molecules", *Langmuir* **32** (31), 7958-7964, (2016) 査読有

DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01405

(4) Komura, N., Suzuki, K. G. N., Ando, H., Konishi, M., Koikeda, M., Imamura, A., Chadda, R., Fujiwara, T. K., Tsuboi, H., Sheng, R., Cho, W., Furukawa, K., Furukawa, K., Yamauchi, Y., Ishida, H., Kusumi, A., Kiso, M. "raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor", *Nat. Chem. Biol.* **12**, 402-410, (2016) 査読有

DOI: 10.1038/nchembio.2059

(5) Tanimoto, Y., Okada, K., Hayashi, F., Morigaki, K. "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", *Biophys. J.* **109** (11), 2307-2316, (2015) 査読有

DOI: 10.1016/j.bpj.2015.10.015

(6) Okada, F., Morigaki, K. "Micropatterned model membrane with quantitatively controlled separation of lipid phases", *RSC Adv.* **5** 1507-1513, (2015)

DOI: 10.1039/C4RA09981H

### 〔学会発表〕(計 35 件)

(1) Morigaki, K., Tanimoto, Y., Hayashi, F. "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", 251st American Chemical Society National Meeting, 2016 年 3 月 13-17 日, San Diego, USA

(2) Morigaki, K., "Micro-/ nano-compartments between substrate-supported model membrane and silicone elastomer", TethMem 2015, 2015 年 11 月 8-11 日, Singapore

(3) Morigaki, K., "Patterned lipid bilayer on solid substrate as a versatile model system of the biological membrane", Biological Research Centre, Hungarian Academy of Science, 2015 年 8 月 31 日, Szeged, Hungary

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ナノギャップ構造型基板

発明者: 森垣 憲一

権利者: 国立大学法人神戸大学

種類: 特願

番号: 2015-001194

出願年月日: 2015 年 1 月 6 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: 多様なチトクロム P450 分子種の酵素活性を網羅的かつ高効率で測定する方法及びキット

発明者: 森垣憲一、達吉郎、常鋼、今石浩正

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人神戸大学

種類: 特許

番号: 5713318 号

取得年月日: 2015 年 3 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: ポリマー脂質二分子膜を用いた機能性基板

発明者: 森垣憲一、岡崎敬、達吉郎、中島芳浩

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 5532229 号

取得年月日: 2014 年 5 月 9 日

国内外の別: 国内

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-nowstone/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森垣 憲一 (Morigaki Kenichi)  
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授  
研究者番号：10358179

### (2) 研究分担者

林 文夫 (Hayashi Fumio)  
神戸大学・大学院理学系研究科・名誉教授  
研究者番号：80093524  
鈴木 健一 (Kenichi Suzuki)  
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・特定拠点准教授  
研究者番号：50423059  
笠井 倫志 (Kasai Rinshi)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教  
研究者番号：20447949