

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07006

研究課題名(和文) 膜タンパク質の機能・構造に対する脂質の影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of effects of lipids on function and structure of membrane proteins

研究代表者

野澤 彰 (Nozawa, Akira)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：30432800

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)：本研究では、ミトコンドリア内膜に局在する輸送体タンパク質ミトコンドリアキャリアとミトコンドリアキャリアと相互作用することが知られている脂質カルジオリピンをモデル膜タンパク質-脂質系として用い、膜タンパク質の機能および構造に対する脂質の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究では、酵母とマラリア原虫のミトコンドリアキャリアを対象に輸送活性に対するカルジオリピンの影響を解析した。その結果、カルジオリピンの添加によりミトコンドリア膜の局在するものは輸送活性が上昇するが、他の膜系に存在するしないものには活性促進効果が見られないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using mitochondrial carriers and a lipid, cardiolipine, which is known to interact with the mitochondrial carrier, as a model membrane protein-lipid system, we clarified roles of lipids against the function and structure of the membrane protein. In this study, the effect of cardiolipin on transport activity of yeast and malaria parasite mitochondrial carriers was analyzed. As a result, it was clarified that addition of cardiolipin increases the transport activity of the mitochondrial carriers localized in mitochondrial membrane, but such an effect was not observed in the mitochondrial carriers present in other membrane systems.

研究分野：膜輸送体タンパク質の機能解析

キーワード：ミトコンドリアキャリア カルジオリピン プロテオリポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の機能解析や構造解析の結果から、特定の脂質が膜タンパク質に結合することにより機能や構造に影響を与えていることが明らかになってきた。これまでの研究結果から、膜タンパク質が脂質と結合することで構造と活性が変化することが示されているが、膜タンパク質が脂質と結合することの生理学的意義を含め、膜タンパク質の働きに関する脂質の影響に関してはまだ十分に研究が進んでいない。

申請者らは、コムギ無細胞合成系にリポソームを添加することにより膜タンパク質をリポソームとの複合体として合成する方法を開発してきた。この方法を基盤としたプロテオリポソーム再構成系を構築し、これまでに様々な膜輸送体タンパク質の機能解析に成功している。この再構成系を利用し最近我々は、ミトコンドリアキャリア(MC)の輸送活性にミトコンドリア内膜に特異的に存在する脂質であるカルジオリピンが影響を与える結果を得た。MCファミリータンパク質はミトコンドリア内膜に局在し、プロトン、アミノ酸、核酸、NADやコエンザイムAなど大きさや構造の異なる多様な分子の輸送を担う膜輸送体タンパク質である。MCファミリータンパク質は、真核生物では最大のファミリーを形成する輸送体タンパク質ファミリーの一つで、出芽酵母ゲノムでは35個の遺伝子の存在が報告されている。申請者は、酵母のミトコンドリアキャリアとカルジオリピンをモデル系として用いることで膜タンパク質に対する脂質の影響を多角的に解析することが可能と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア内膜に局在する輸送体タンパク質MCとMCと相互作用することが知られている脂質カルジオリピンをモデル膜タンパク質-脂質系として用い、膜タンパク質の機能および構造に対する脂質の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) リポソーム脂質組成の検討

申請者らは、コムギ無細胞合成系にリポソームを添加することにより膜タンパク質をリポソームとの複合体として合成し、この複合体を遠心処理により沈殿として回収した後、基質内封リポソームと混合し凍結融解および超音波処理を行うことにより基質内封プロテオリポソームを調製する方法を考案した。本研究では、リポソームの脂質組成の影響を解析する。そこで、まず最初に合成時に添加するリポソームと基質内封リポソームの脂質組成の検討を行った。

### (2) 酵母MCタンパク質の輸送活性に対するカルジオリピンの影響の解析

脂質組成の異なるリポソームを添加したコムギ無細胞翻訳系により、酵母MCタンパク質タンパク質を合成した。遠心分離による粗精製を行った後、基質を内包したリポソームと混合し凍結融解および超音波処理によってプロテオリポソームを調製した。ラジオアイソトープ標識された輸送基質のプロテオリポソーム内への輸送量を液体シンチレーションカウンターにより測定し、再構成輸送体の輸送活性を解析し、脂質の輸送活性に対する影響を評価した。

### (3) 酵母以外の生物由来のMCタンパク質の輸送活性に対するカルジオリピンの影響の解析

ミトコンドリア膜にカルジオリピンを含まない生物種からMCをコードする遺伝子を単離した。これらを用いて無細胞系によりMCタンパク質を合成し、輸送活性に対するカルジオリピンの効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) リポソーム脂質組成の検討

予備実験でカルジオリピンの添加により活性上昇が観察されていた幾つかのMCを用いて、合成時に添加するリポソームと基質内封リポソームの脂質組成の検討を行った。その結果、カルジオリピンの活性上昇効果は合成時に添加するリポソームと基質内封リポソームの両方にカルジオリピンを添加した時に観察されるものの、どちらか一方のリポソームにしか添加しない場合には効果が観察されないことが明らかになった。そこで、これ以降の実験では、カルジオリピンを添加する場合には両方のリポソームに添加することとした。

### (2) 酵母MCタンパク質の輸送活性に対するカルジオリピンの影響の解析

6種の酵母MCを用いて、輸送活性に対するカルジオリピンの影響を検討した。その結果、ミトコンドリア内膜に局在するMCはすべてカルジオリピンを添加したリポソームを使用した時に活性が上昇した。一方、ペルオキシソーム膜に局在するAnt1pに関しては、そのような効果は観察されなかった。

### (3) 酵母以外の生物由来のMCタンパク質の輸送活性に対するカルジオリピンの影響の解析

ミトコンドリア膜にカルジオリピンを含まないと考えられる幾つかの生物のMCを用いて、輸送活性に対するカルジオリピンの影響を調べた。その結果、酵母以外にもミトコンドリア膜にカルジオリピンを含まない生物種由来のMCはカルジオリピン添加リポソームの使用時に高い活性が検出されたのに対し、ミトコンドリア膜にカルジオリピンを含まないと考えられる生物種由来のMCではそのような効果は観察されなかった。

以上の結果より、本申請研究により無細胞

系を利用した MC タンパク質の活性に対するカルジオリピンの影響を検討する解析系を構築することに成功し、その系を用いた研究結果から、ミトコンドリア内膜に局在する MC と別の膜画分に局在する MC では、活性に対するカルジオリピンの効果が異なることが明らかになった。また、膜の脂質組成が異なる生物種間の MC についても、カルジオリピンの効果が異なっていることが明らかになった。これらの結果は、MC は進化の過程でそれらが局在する膜環境下で高い活性を有するように変異していくことを示しているのかもしれない。

#### 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6件)

Keiichiro Nemoto, Makiko Kagawa, Akira Nozawa, Kentaro Tomii, Kenichiro Imai, Yoshinori Hasegawa, Minoru Hayashi, Tatsuya Sawasaki (2018) Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system. *Sci. Rep.* 8: 4268. 査読あり

doi: 10.1038/s41598-018-22538-9.

Keiichiro Nemoto, Akira Nozawa, Satoshi Yamanaka, Shunsuke Nomura, Kohki Kido, and Tatsuya Sawasaki (2017) Autophosphorylation Assays Using Plant Receptor Kinases Synthesized in Cell-Free Systems. *Methods in Molecular Biology* 1621: 113-120. 査読なし

doi: 10.1007/978-1-4939-7063-6\_11.

Akira Nozawa, Keiichiro Nemoto, Shunsuke Nomura, Satoshi Yamanaka, Kohki Kido, and Tatsuya Sawasaki (2017) Cell-Free Synthesis of Plant Receptor Kinases. *Methods in Molecular Biology* 1621: 37-46. 査読なし

doi: 10.1007/978-1-4939-7063-6\_4.

Kazuhiro Sakamaki, Takahiro M. Ishii, Toshiya Sakata, Kiwamu Takemoto, Chiyo Takagi, Ayako Takeuchi, Ryo Morishita, Hirotaka Takahashi, Akira Nozawa, Hajime Shinoda, Kumiko Chiba, Haruyo Sugimoto, Akiko Saito, Shuhei Tamate, Yutaka Satou, Sang-Kee Jung, Satoshi Matsuoka, Koji Koyamada, Tatsuya Sawasaki, Takeharu Nagai, Naoto Ueno (2016) Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1863: 2766-2783. 査読あり

doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.010.

Herbert Santos, Kenichiro Imai, Takashi Makiuchi, Kentaro Tomii, Paul Horton, Akira Nozawa, Mohamed Ibrahim, Yuzuru Tozawa, and Tomoyoshi Nozaki (2015) A

novel mitochondrial  $\beta$ -barrel outer membrane protein in *Entamoeba*. *Sci. Rep.* 5: 8545. 査読あり

doi: 10.1038/srep08545.

Fumika Mi-ichi, Akira Nozawa, Hiroki Yoshida, Yuzuru Tozawa, and Tomoyoshi Nozaki (2015) Evidence that *Entamoeba histolytica* mitochondrial carrier family links mitochondrial and cytosolic pathways through exchange of PAPS and ATP. *Eukaryot. Cell* 14: 1144-1150. 査読あり

doi: 10.1128/EC.00130-15.

#### [学会発表](計20件)

神川 龍馬、Daniel Moog、野澤 彰、戸澤 譲 (2018) 非光合成珪藻類葉緑体トリオースリン酸輸送体の基質特異性と紅藻類由来葉緑体進化 第42回日本藻類学会 仙台

野澤 彰、村社 真理音、澤崎 達也 (2017) リボソーム添加型コムギ無細胞合成法を利用した膜電位を駆動力とする膜輸送体の輸送活性測定系の構築 第58回日本植物生理学会年会 鹿児島

野澤 彰、名樂 仁、松井 司、井上 寛之、佐々木 孝行、山本 洋子、戸澤 譲、有村 源一郎、根本 圭一郎、澤崎 達也 (2017) シロイヌナズナ PAPS 輸送体 PAPST2 の解析 トランスポーター研究会 仙台

Mario Murakoso, Tatsuya Sawasaki, and Akira Nozawa (2017) Establishment of transport activity analysis system for membrane potential-dependent transporters based on cell-free protein synthesis system. The 15th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Matsuyama.

Hiroiyuki Inoue, Yuzuru Tozawa, and Akira Nozawa (2016) Effect of cardiolipin on the transport activity of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial carrier proteins. 第57回日本植物生理学会年会 盛岡

見市 文香、野澤 彰、吉田 裕樹、戸澤 譲、野崎 智義 (2016) 赤痢アメーバ“マイトソーム”の PAPS 輸送体の同定 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎

Hitoshi Myoraku, Mario Murakoso, Reina Hirose, Kengo Fujita, Tatsuya Sawasaki, and Akira Nozawa (2016) Transporter protein analysis system by in vitro reconstitution system based on wheat-germ cell-free system. The 14th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Matsuyama.

村社 真理音、澤崎 達也、野澤 彰 (2016) コムギ無細胞合成系を用いた膜電位を駆動力とする膜輸送体の輸送活性測定系の構築 日本植物学会第80回沖縄大会 沖縄

廣瀬 湊奈、野澤 彰、澤崎 達也 (2016) コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた熱帯熱マラリア原虫のアピコプラスト

ランスポーターを阻害する薬剤探索 無細胞生命科学研究会 雫石  
野澤 彰 (2016) 無細胞タンパク質合成系を基盤とした膜輸送体タンパク質機能解析系構築とその応用 愛媛大学生命機能科学応用開発研究グループ第4回講演会 愛媛大学農学部  
名樂 仁、井上 寛之、佐々木 孝行、山本 洋子、戸澤 讓、澤崎 達也、野澤 彰 (2016) シロイヌナズナ PAPS 輸送体 PAPST2 の解析 第39回日本分子生物学会年会 横浜  
名樂 仁、井上 寛之、戸澤 讓、野澤 彰 (2015) シロイヌナズナ PAPST1 ホモログ At3g51870 の機能解析 中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会 松山  
野澤 彰 (2015) コムギ無細胞系を利用した膜輸送体タンパク質機能解析系の構築 トランスポーター研究会 東京  
Y. Suzuki, A. Nozawa, Y. Tozawa, R. Tero. (2015) AFM observation of voltage-dependence K<sup>+</sup> channel KAT1 reconstructed to asolectin supported lipid bilayer. Eighth International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics. Tokyo.  
野澤 彰 (2015) 無細胞合成系を基盤とした膜輸送体タンパク質のインビトロ解析 植物の栄養研究会 東京  
Herbert J. Santos, Kenichiro Imai, Takashi Makiuchi, Kentaro Tomii, Paul Horton, Akira Nozawa, Mohamed Ibrahim, Yuzuru Tozawa, and Tomoyoshi Nozaki (2015) A novel mitochondrial  $\beta$ -barrel outer membrane protein in Entamoeba. The 13th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Matsuyama.  
Yuki Shimonosono, Yuya Sasaki, Tomoaki Izumi, Satoru Doi, Yuzuru Tozawa, and Akira Nozawa (2015) Functional analysis of Cyanidioschyzon merolae mitochondrial carrier proteins. The 13th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Matsuyama.  
野澤 彰 (2015) 無細胞タンパク質合成系を基盤とした膜輸送体タンパク質機能解析系構築の試み 第10回無細胞生命科学研究会 横浜  
井上 寛之、戸澤 讓、野澤 彰 (2015) 膜輸送体タンパク質の機能・構造に対する脂質の影響 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 神戸  
下ノ園 有輝、佐々木 勇弥、泉 智明、土井 悟、戸澤 讓、野澤 彰 (2015) Cyanidioschyzon merolae ミトコンドリアキャリアの機能解析 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 神戸

〔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

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/cell-free/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤 彰 (NOZAWA, Akira)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号: 30432800

(2) 連携研究者

戸澤 讓 (TOZAWA, Yuzuru)

埼玉大学・大学院・理工学研究科・教授

研究者番号: 90363267