

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K08194

研究課題名(和文)膜貫通ヘリックス固定型tethered膜の作製と膜内タンパク質補足計測

研究課題名(英文)Development of helix-anchored planar membrane

研究代表者

矢野 義明(Yano, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：60402799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膜貫通ヘリックスの末端をガラス基板の上に固定した繋ぎ止め膜(テザ膜)作製法を確立した。まずPEGコートしたガラス表面にリボソームを添加し平面膜を形成する手法を確立した。次にビオチン標識した膜貫通ヘリックスAALALAA AGLALGA AALALAAをアビジン標識量子ドットで検出する方法により、モデル膜貫通ヘリックスを固定した状態で平面膜を形成できること、固定化したペプチドの膜挿入トポロジーをコントロールできることを明らかにした。この系は膜内でのタンパク質間相互作用を検出する系に応用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜受容体など創薬に関連するものも多い膜貫通タンパク質の機能を解明するには、細胞膜疎水部でのタンパク質間相互作用の解析が重要であるが、会合自由エネルギーや会合・解離速度定数を調べる簡便な手法が確立できれば大きな利点がある。本研究では膜内で相互作用する膜貫通ヘリックスの片方をガラス基板の上に固定した繋ぎ止め膜(tethered膜)を作製した。この技術は、蛍光標識したもう片方の分子と可逆に相互作用する際に、側方拡散が抑制される事を利用して蛍光相関分光法(FCS)や光褪色後蛍光回復法(FRAP)で相互作用力を迅速に評価する系に応用できる。

研究成果の概要(英文)：In This study, we developed peptide-anchored planar lipid bilayers. Model transmembrane helix was attached to a PEG-coated glass using click chemistry. Liposomes were incubated on the glass surface to form planar lipid bilayers. These bilayers had fluidity but the model peptides were immobile because of tethering. Biotin-avidin interaction revealed that the model peptides were successfully inserted into the bilayers. Thus, we established a preparation method of planar lipid bilayers including immobile peptides with defined insertion topology, which can laterally trap other molecules in the membranes.

研究分野：生体膜の生物物理学

キーワード：モデル膜貫通ヘリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質には膜受容体など創薬ターゲット分子が多く含まれる。しかしながら、生体膜の疎水部環境は溶液環境と比較して測定手法に制限が多く、特に動的挙動の検出は容易でない。また、膜タンパク質同士が相互作用する場合には、膜外ドメインと膜内ドメイン間相互作用のいずれも駆動力となりうるが、膜内相互作用に焦点をあてた研究手法・研究例は限られており、その原理原則は不明な部分が多い。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。

近年、一分子計測技術の発展により、生細胞膜における膜タンパク質の動的挙動計測が行われるようになってきている。膜分子の側方拡散挙動を直接観測可能であり、共局在や FRET 解析から分子間相互作用も検出できる。しかし、一分子蛍光法では低密度のタンパク質発現条件下の強い相互作用しか検出できない。また速度定数などの解析には動画処理による分子トラッキングが必要であり、比較的時間を要する。他の手法の現状を踏まえても、モデル膜や生細胞膜疎水部での相互作用を定量でき、かつより利便性の高い新規研究手法を開発できれば非常に有用である。申請者はこれまでに、脂質二分子膜環境で測定が可能でかつ従来法よりも定量性・一般性に優れた実験系として、1) ヘリカルな膜蛋白質の基本骨格である膜貫通ヘリックスを形成する疎水性ペプチドを用いて、膜中のヘリックスの安定性や自己会合力を熱力学量・速度定数として計測する方法および2) コイルドコイル型2量体を形成するペプチドペアを用いて、生細胞で特定の膜蛋白質を蛍光標識する方法を確立してきた。前者では、膜タンパク質フォールディングの基本過程であるヘリックス間相互作用が脂質の影響を大きく受ける事が明らかになり、後者で生細胞での会合状態や内在化を蛍光イメージング画像から定量することが可能になった。しかし、これらの測定法には制限もある。

2. 研究の目的

本研究では生細胞膜の膜疎水部でのタンパク質相互作用を側方拡散変化から検出する上で、片側の分子を膜貫通ヘリックスとして基板に固定した膜貫通ヘリックス固定型 tethered 膜を用いることで、単なる会合による分子量増大由来の側方拡散抑制に比べて格段に検出が容易になるのではないかと着想した。表面固定した膜貫通ヘリックスは疎水性のアンカーとして生体膜を繋ぎ止める(テザリング)とともに、もし生体膜構成分子である膜タンパク質や脂質と膜内で動的に相互作用すれば、相手分子を捕捉して側方拡散を抑制すると考えられる。本課題ではこの基盤技術となる新規繋ぎ止め膜作成法の開発と相互作用力測定を行う。

具体的には、ヘリックス型膜タンパク質の基本骨格である膜貫通ヘリックス構造を介してガラス基板の上に保持されるタイプの繋ぎ止め膜(膜貫通ヘリックス固定型 tethered 膜)作製法を開発する。側方拡散性を保ったまま脂質二分子膜を保持できるような脂質固定型 tethered 膜の先行研究を参考に、合成膜貫通ヘリックス ポリエチレングリコール(PEG)

ガラス基板の架橋を行う。リポソーム、生細胞を用いて tethered 膜作成が可能か検討を行う。蛍光標識ヘリックスを用いて表面密度測定および膜貫通配向を確認する。作成法が確立できれば、モデル膜貫通ペプチドやチロシンキナーゼ型受容体由来の膜貫通配列を用

いて、側方拡散の変化を蛍光相関分光法(FCS)および光褪色後蛍光回復法(FRAP)で測定し、相互作用力を簡便に評価する手法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) Tethered 膜用基板の作成

カバーガラスを 1 M KOH 中で 20 分間超音波洗浄し、超純水で KOH を十分に洗い流し N₂ ガスで乾燥させた。続いてパーナーで 1 秒間カバーガラスを炙り、メタノール中で 10 分間超音波洗浄したのち、メタノール / 酢酸 / N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane (94/5/1, v/v/v) 中で 20 分間インキュベートすることでカバーガラス表面にアミノ基を導入した。0.1 M NaHCO₃ に DPPE – PEG – NHS (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-(polyethylene glycol)-succinimidyl ester MW, 5000) 及び DBCO – PEG – NHS (dibenzocyclooctyne-(polyethylene glycol)-succinimidyl ester MW, 5000) を 7 : 3 の割合で合計 5 mM になるよう溶解し、ガラス表面に滴下し 3 時間インキュベートしたのち、超純水でカバーガラスを十分に洗浄した。

膜貫通ヘリックスを形成するペプチド (Table 1) のガラス表面への固定は、DPPE – PEG – NHS、DBCO – PEG – NHS でコーティングしたカバーガラス上に、モデルペプチド 5 μM の TFE/水 (1/1 v/v) 溶液を滴下し、2 時間インキュベートすることにより行った。TFE/水 (1/1 v/v) によりカバーガラスを十分に洗浄した。ガラス表面へ固定されたモデルペプチドの確認は、共焦点顕微鏡によって行った。

Table 1 合成した各モデルペプチドの配列

ペプチド番号	配列
1	TMR – AALALAA AGLALGA AALALAA – K(N ₃)
2	TMR – AALALAA AGLALGA AALALAA – ββ – K(biotin) – ββ – K(N ₃)
3	TMR – ββ – K(biotin) – ββ – AALALAA AGLALGA AALALAA – K(N ₃)

(β : ベータアラニン, K(N₃) : アジドリシン, K(biotin) : ビオチンリシ)

(2) Tethered 膜の形成と観察

常法により作製した large unilamellar vesicles (LUV) を含むトリス緩衝液を DPPE – PEG – NHS 及び DBCO – PEG – NHS によりコーティングしたカバーガラス上に滴下し 2 時間インキュベートすることで LUV をカバーガラス上へ吸着させた。トリス緩衝液及び超純水でカバーガラスを十分に洗浄したのち、N₂ ガスでカバーガラスを完全に乾燥させた。再びカバーガラス上にトリス緩衝液を加え再水和させることでカバーガラス上に平面膜を形成させた。平面膜の形成及び評価は共焦点顕微鏡によって行った。

カバーガラス上に形成された平面膜の一部に 488 nm レーザーを出力最大で照射することで平面膜を標識した NBD を退色し、退色直後と 1 分後に共焦点顕微鏡で平面膜の退色部位の蛍光を観察することで平面膜の膜流動性を評価した。ビオチン アビジン相互作用によりヘリックスの膜貫通トポロジーを調べる場合は、平面膜を形成したカバーガラス上へ、ストレプトアビジン修飾量子ドット (Qdot 655 streptavidin conjugate) を終濃度 25 nM になるようにカバーガラス上に添加し、30 分間インキュベートしたのち、トリス緩衝液に

より充分に洗浄し、共焦点顕微鏡により平面膜を観察した。

4. 研究成果

コーティング操作を施していないカバーガラス、PEG-NHSのみでコーティングを施したカバーガラス、PEG-NHS / DPPE-PEG-NHS (3/7) でコーティングを施したカバーガラスの3種類に対し、蛍光標識 LUV を添加しインキュベート後洗浄した。コーティング操作を施していないカバーガラスには LUV の非特異吸着による蛍光が見られ、また PEG コーティングを施したカバーガラスでは非特異吸着が減少している様子が観察された。一方 DPPE-PEG 存在下ではガラス表面に蛍光が見られたことから、LUV はガラス表面に固定された DPPE によってトラップされ、ガラス表面へ吸着したと考えられる。また、DPPE-PEG 存在下でガラス表面に LUV が吸着した状態で、乾燥後に再水和した。乾燥と再水和を行う前では不均一に蛍光が見られたが、乾燥と再水和後には均一に蛍光が見られた。さらに、均一な蛍光が見られた部分の一部をレーザーにより退色したところ、1 分後には退色部位の蛍光の回復が見られた。このことから、退色部位とその周辺は連続した一つの平面膜を形成していると考えられる。

DPPE-PEG-NHS / DBCO-PEG-NHS (7/3) でコーティングしたカバーガラスと DPPE-PEG-NHS のみでコーティングしたカバーガラスに対し C 末端にアジドリシンを導入したモデルペプチド 1 を添加し、洗浄した。アルキンである DBCO 存在下ではモデルペプチドを標識した TMR による蛍光が見られた。このことから、DBCO とペプチド中のアジドが架橋を形成し、ペプチドがガラス表面へ固定されたと考えられる。また、ペプチドをガラス表面に固定した状態で平面膜を形成し、一部分をレーザーにより退色したところ、1 分後には NBD の蛍光は回復が見られたが、TMR の蛍光は回復が見られなかった。このことから、モデルペプチドはガラス表面に固定され動かない状態でかつ平面膜は流動性を持っていると考えられる。

次に、C 末端もしくは N 末端にビオチンリシンを導入したモデルペプチドをガラス表面に固定した状態で平面膜を形成し、ストレプトアビジン修飾量子ドットを添加した。C 末端側をビオチン修飾したモデルペプチド 2 を用いた場合、ビオチンが膜下部に存在するためストレプトアビジン修飾量子ドットに認識されないと予想される。一方 N 末端側をビオチン修飾したモデルペプチド 3 ではビオチンが膜上部に存在するため量子ドットにより認識され蛍光が見られると予想される。モデルペプチド 2 を固定した場合にはほとんど量子ドットの蛍光が見られなかったのに対し、モデルペプチド 3 を固定した場合には量子ドットの蛍光が強く見られ、予想と一致した結果となった。

コーティング処理を施していないカバーガラスで見られたリポソームの非特異吸着が PEG コーティングにより抑えられていたことから PEG コーティングは充分に施されたと考えられる。また、ガラス表面に DPPE が存在する場合にはリポソームの吸着が見られたことから DPPE によりリポソームがガラス表面にトラップされたと考えられる。また、本研究では DPPE によってガラス表面に吸着したリポソームを乾燥と再水和により平面膜にした。これまで先行研究では、平面膜を作製する手法として、浸透圧や超音波処理、電荷の付与が主に用いられてきた。しかし、浸透圧や超音波処理では再現良くかつ効率良く平面膜を形成することができず、また電荷の付与は膜の物性に及ぼす電荷の影響を避けられない。しかし今回用いた乾燥と再水和による手法は比較的簡便に再現良く平面膜を形成することができたため、平面膜を形成する手法として非常に有用であると考えられる。ま

た、モデルペプチドを固定した状態で平面膜を形成した際、平面膜を標識した NBD 由来の蛍光は退色後に蛍光の回復が見られたが、モデルペプチドを標識した TMR による蛍光の回復は見られなかった。このことから、モデルペプチドはガラス表面に固定され動かない状態でかつ平面膜は流動性を持っていると考えられる。

N 末端側をビオチンで修飾したモデルペプチドをガラス表面に固定した平面膜では量子ドットの結合が見られたのに対し、C 末端側をビオチンで修飾したモデルペプチドでは量子ドットの結合がほとんど見られなかった。このことから、モデルペプチドはアジド修飾された C 末端を膜下部に、一方 N 末端は膜上部に位置するように膜挿入されていることが示唆された。このことから、ガラス基板に固定するためのアジド修飾の位置によって、モデルペプチドの膜挿入トポロジーをコントロールすることができると考えられる。

本研究により、モデルペプチドをガラス表面に固定した状態で平面膜を簡便に形成させる手法を確立した。また、固定するモデルペプチドの膜挿入トポロジーをコントロールできるとということが示唆された。本研究により確立された平面膜作製手法は、膜中分子間相互作用を評価することのできる新規技術への応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) Yusuke Higashi, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki, Development of peptide-anchored planar lipid bilayers., 10th international peptide symposium 2018 年 12 月 03 日～2018 年 12 月 7 日. ロームシアター京都 (京都府) ポスター発表

〔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

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松崎 勝巳

ローマ字氏名：MATSUZAKI, Katsumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。