

令和元年6月14日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06704

研究課題名(和文) アミノ酸一次配列に基づいた小胞体膜スクランブラーゼの新規同定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new identification method of the endoplasmic reticulum membrane scramblases based on the amino acid primary sequence

研究代表者

中尾 裕之(Nakao, Hiroyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：00805020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体膜では非常に速いリン脂質のフリップフロップ(二層間の移動)が起きているものの、それを担うタンパク質「スクランブラーゼ」は未だ同定されていない。本研究では、様々な配列の合成ペプチドのスクランブラーゼ活性を評価することで、親水性度の高いアミノ酸残基が膜貫通ヘリックスの同じ側に位置することが高いスクランブラーゼ活性を生み出す特徴であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした高いスクランブラーゼ活性を生み出す特徴はアミノ酸一次配列から判断できるものであり、今後小胞体膜スクランブラーゼを探索する際に非常に有用な情報となりうる。また、親水性度の高いアミノ酸残基は、すでに同定されている細胞膜スクランブラーゼの膜貫通領域にも多くみられることから、本研究の知見はその脂質スクランブリングメカニズムの解明にも役立つ情報であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid transbilayer movement (flip-flop) occurs constantly and very frequently in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. However, ER scramblases, which are responsible for the rapid flip-flop, have not been identified yet. In this study, we have assessed the scramblase activities of various kinds of synthetic peptides, and demonstrated that the same side positioning of strongly hydrophilic residues enhanced the scramblase activities of transmembrane peptides.

研究分野：生物物理化学

キーワード：フリップフロップ スクランブラーゼ リン脂質 小胞体 蛍光

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

1. 研究開始当初の背景

脂質二重層中のリン脂質のフリップフロップ(二層間の移動)は、脂質のみの人工膜ではほとんど起こらないが、生体膜では膜タンパク質により様々に制御され、膜構造の維持やシグナル伝達に参与している。小胞体膜では、脂質合成が細胞質側のみで行われるため、二重層構造を維持するには新たに合成されたリン脂質が速やかに内腔側に移動しなければならない。そのため、小胞体膜では非常に速いフリップフロップが常に生じているが、それを促進するタンパク質「スクランブラーゼ」は未だ同定されていない。これまでの研究から、小胞体膜一回膜貫通タンパク質 EDEM1 の膜貫通配列ペプチドが非常に高い活性を示すこと、及び、このペプチドの活性には 4 残基間隔で並んだ Arg・His 残基が必要であることを明らかにした。これらの結果から、EDEM1 が小胞体膜スクランブラーゼとして機能すること、及び、膜貫通領域で親水性アミノ酸残基がヘリックスの同じ側に位置することが高いスクランブラーゼを生み出す特徴であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、高いスクランブラーゼ活性を生み出す膜貫通配列の特徴を明らかにすることを目指した。膜貫通領域で親水性アミノ酸残基がヘリックスの同じ側に位置することが高いスクランブラーゼを生み出すという仮説をもとに、様々な配列のモデル膜貫通ペプチドを合成し、ペプチドを組み込んだ人工脂質膜小胞(リポソーム)のフリップフロップを測定した。

3. 研究の方法

(1) リポソーム調製

メタノール・クロロホルム混合溶媒に溶解した脂質とトリフルオロエタノールに溶解したペプチドを混合し、溶媒を除去して薄膜を形成した。そこに pH 7.4 の緩衝液を加えて水和した。凍結融解を 5 回行った後、エクストルージョン法により直径約 140 nm のリポソームを調製した。

(2) 円二色性スペクトル測定

ペプチド/脂質比が 0.2 mol% のリポソームを用いた。光路長 1 mm のセルを用いて、200-250 nm の範囲で、25 ° で測定した。10 回測定した平均値から、脂質のみのリポソームをブランクとして差し引いた値を測定値とした。

(3) フリップフロップ測定

ペプチドを組み込んだリポソームに蛍光脂質 C₆NBD-PC を添加することで、外葉のみを蛍光標識した非対称リポソームを作成した。非対称リポソームを 37 ° でインキュベーションし、フリップフロップして最終的に両側対称に分布するまでの時間変化をフリップフロップ速度として評価した。蛍光脂質の膜内外の分布を評価するために、水溶性の膜を透過しない消光剤 dithionite を添加し、外葉に残存する蛍光脂質からの蛍光を消光した。消光剤添加前後の蛍光強度比から内葉に移行(フリップ)した蛍光脂質の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) 脂質膜中のペプチドの二次構造評価

新たにデザインしたペプチドが脂質膜中で膜貫通構造をとるかどうかを、CD スペクトルから評価した。すべてのペプチドにおいて、ヘリックスに特徴的なスペクトルが見られた。さらに、ヘリックス含有率を計算したところ、68-88% であった。この値はペプチドが膜貫通構造をとるのに十分な割合であることから、すべてのペプチドが膜貫通構造をとっていることが示唆された。

(2) Arg・His の相対的な位置がスクランブラーゼ活性に与える影響の評価

親水性アミノ酸残基の膜貫通ヘリックスにおける相対的な位置がペプチドのスクランブラーゼ活性に与える影響を評価するため、Arg・His 残基の間隔が 1~9 残基のペプチドのスクランブラーゼ活性を評価した。その結果、ペプチドのスクランブラーゼ活性は Arg・His 残基のらせん軸周りの回転角にしたがって周期的に変化した。特に、Arg・His 残基の間隔が 3、4、7 残基のペプチドが高いスクランブラーゼ活性を示したことから、親水性アミノ酸残基が同じ側に位置することにより高いスクランブラーゼ活性を生み出す特徴であることが明らかになった。

(3) アミノ酸残基の親水性度がスクランブラーゼ活性に与える影響の評価

(2) で見られた高いスクランブラーゼ活性が Arg・His 残基という組み合わせに特異的な現象なのかを明らかにするため、Arg・His 残基の間隔が 3 残基のペプチドをもとに、Arg・His を様々なアミノ酸残基に置換したペプチドの活性を評価した。Arg 残基を Lys 残基や Gln 残基に置換したペプチドや、His 残基を Gln 残基に置換したペプチドではスクランブラーゼ活性が見られたのに対して、Arg 残基を Ala 残基に置換したペプチドや His 残基を Ser 残基や Leu 残基に置換したペプチドでは活性が消失した。このことから、親水性度の高いアミノ酸残基がペプチドのスクランブラーゼ活性に必要なことが示された。

(4) Arg・Hisの膜深さがスクランブラーゼ活性に与える影響の評価

(2)で見られた高いスクランブラーゼ活性に親水性残基の膜中での位置が与える影響を評価するため、Arg・His残基の間隔を3残基で固定し、膜中での位置を様々に変えたペプチドのスクランブラーゼ活性を評価した。その結果、Arg・His残基の位置を膜表面に近づけたペプチドでは活性が見られず、膜中央に近づけたペプチドでは活性が増大した。これは、親水性アミノ酸残基が膜深くに位置することがスクランブラーゼ活性に重要であることを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

(1) H. Nakao, C. Hayashi, K. Ikeda, H. Saito, H. Nagao, M. Nakano, Effects of Hydrophilic Residues and Hydrophobic Length on Flip-Flop Promotion by Transmembrane Peptides. *J. Phys. Chem. B*, 2018, 122, 4318-4324, 査読有

DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b00298

(2) R. Takaoka, H. Kurosaki, H. Nakao, K. Ikeda, M. Nakano, Formation of Asymmetric Vesicles via Phospholipase D-Mediated Transphosphatidylolation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 2018, 1860, 245-249, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbmem.2017.10.011

[学会発表](計24件)

(1) 中尾裕之、杉本佑太、池田恵介、斎藤大明、中野実、親水性アミノ酸残基の位置・膜深さが膜貫通ペプチドのスクランブラーゼ活性に与える影響、日本薬学会第139年会、2019年

(2) 藤原裕平、中尾裕之、池田恵介、中野実、ベシクル可溶化による脂質二重層中でのリン脂質-リン脂質分子間相互作用に伴う熱力学量の測定、日本薬学会第139年会、2019年

(3) 清水千夏、中尾裕之、池田恵介、中野実、リン脂質-ペプチドナノファイバー形成過程の可視化、日本薬学会第139年会、2019年

(4) 黒崎晴子、中尾裕之、池田恵介、中野実、Phospholipase Dによる脂質非対称性リポソームの作成、日本薬学会第139年会、2019年

(5) 中尾裕之、池田恵介、中野実、リン脂質フリップフロップを促進する小胞体膜タンパク質膜貫通配列の探索、第10回生体界面研究会、2019年

(6) T. Sugiura, U. Yoshida, H. Nakao, K. Ikeda, M. Nakano, Quantitative analysis of Sec14-mediated lipid transfer by using small-angle neutron scattering, Asian Biophysics Association Symposium and Annual Meeting of the Australian Society for Biophysics, 2018年

(7) 佐々木哲哉、中尾裕之、池田恵介、中野実、Amyloid- β と脂質膜の相互作用における膜曲率および酸性リン脂質の影響、日本薬学会北陸支部第130回例会、2018年

(8) 岩下侑矢、中尾裕之、池田恵介、中野実、示差走査熱量測定を用いたセラミドIIIの結晶性の低下をもたらす物質の探索、日本薬学会北陸支部第130回例会、2018年

(9) 岩下侑矢、中尾裕之、池田恵介、中野実、示差走査熱量測定を用いたセラミドIIIと生体脂質との相互作用の評価、膜シンポジウム2018、2018年

(10) 杉浦太一、中尾裕之、池田恵介、中野実、脂質膜パッキングによるリン脂質輸送タンパク質Sec14の活性制御、膜シンポジウム2018、2018年

(11) 杉浦太一、吉田右京、中尾裕之、池田恵介、中野実、中性子小角散乱法によるリン脂質輸送タンパク質Sec14の脂質輸送機能の解析、第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2018年

(12) 吉野実紗、中尾裕之、池田恵介、中野実、脂質-ペプチドナノファイバー形成の熱力学的解析、第69回コロイドおよび界面化学討論会、2018年

(13) 福田拓己、中尾裕之、池田恵介、中野実、コイルドコイル形成ペプチドを用いたリポソームの会合制御、第69回コロイドおよび界面化学討論会、2018年

(14) 中野実、杉浦太一、中尾裕之、池田恵介、中性子小角散乱によるリン脂質輸送タンパク質の脂質輸送機構の解明、第69回コロイドおよび界面化学討論会、2018年

(15) 杉浦太一、吉田右京、中尾裕之、池田恵介、中野実、Regulation of Sec14-mediated lipid transfer by lipid-membrane environment、第56回日本生物物理学会年会、2018年

(16) 吉田右京、杉浦太一、中尾裕之、池田恵介、中野実、Elucidation of phospholipid transport mechanism of Sec14 homologues、第3回富山・アジア・アフリカ創薬研究シンポジウム、2018年

(17) 稲場陸人、中尾裕之、池田恵介、中野実、Kinetic analysis of phospholipase D activity on phosphatidylcholine bilayers、第3回富山・アジア・アフリカ創薬研究シンポジウム、2018年

(18) 中尾裕之、中尾千尋、池田恵介、斎藤大明、長尾秀実、中野実、膜貫通ペプチドのスクランブラーゼ活性に対する中央残基の親水性度と疎水性配列長の影響の評価、生体コモンスペース研究会、2018年

(19) 吉田右京、杉浦太一、中尾裕之、池田恵介、中野実、Sec14相同タンパク質のリン脂質輸送機構の解明、日本膜学会第40年会、2018年

- (20) 中尾裕之、杉本佑太、池田恵介、中野実、膜貫通ヘリックス中の親水性アミノ酸残基対の位置に依存したリン脂質フリップフロップ促進能の評価、日本膜学会第40年会、2018年
- (21) 岩下侑矢、中尾裕之、池田恵介、中野実、示差走査熱量測定によるセラミドIIIの結晶性低下をもたらす物質の探索、日本薬学会第138年会、2018年
- (22) 稲場陸人、中尾裕之、池田恵介、中野実、Phospholipase Dによる脂質膜上での酵素反応の速度論的解析、日本薬学会第138年会、2018年
- (23) H. Nakao, Y. Sugimoto, K. Ikeda, M. Nakano, Scramblase activities of transmembrane peptides depend on relative position of hydrophilic amino acid residues and their depth in the membrane, 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, 2018年
- (24) 杉本佑太、中尾裕之、池田恵介、中野実、親水性アミノ酸残基の位置に依存した膜貫通ペプチドのリン脂質 flip-flop 促進能の評価、第55回日本生物物理学会年会、2017年

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。