

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05311

研究課題名(和文) 支持脂質膜電気泳動法による巨大膜タンパク質調製と高速AFMによる構造動態解析

研究課題名(英文) Structural dynamics analysis of membrane protein prepared by supported lipid membrane electrophoresis

研究代表者

奥野 貴士 (Okuno, Takashi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの細胞膜で膜の機能を調節する膜タンパク質は、創薬研究における標的タンパク質であり、膜タンパク質の構造や機能解析が、研究推進における重要な役割を担う。しかし、細胞から目的の膜タンパク質を精製するには、豊富な経験と高い技術を必要とするため、膜タンパク質の研究のボトルネックである。本研究は、ヒトの細胞膜で膜の機能を調節する膜タンパク質の新しい調製方法を開発することを目的とした。本研究の実施により、ヒト培養細胞から細胞膜だけを基板に固定した基板支持細胞膜を調製し、ジスフェリン異常症の原因遺伝子ジスフェリンの機能解析に成功した。今後は、基板上でのジスフェリンの濃縮と精製方法を確立する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト培養細胞から細胞膜の修復に関するdyferlin膜タンパク質の新しい調製方法を確立し、dyferlinのカルシウム依存的に変化する物性(側方拡散速度)の計測に成功した。機能計測が困難であったdyferlinの機能解析を非常に簡便にすることができることを示すことができた。今後は、dysferlinだけを濃縮/精製する方法や他のタンパク質に応用することで、創薬研究に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins that regulate membrane function in human cell membranes are target proteins in drug discovery research, and structural and functional analysis of membrane proteins are important in drug development research. However, purification of the target membrane protein from the cells requires abundant experience and high technology, which is a bottleneck in membrane protein research. The purpose of this study was to develop a new method for preparing membrane proteins that regulate membrane function in human cell membranes. We prepared a substrate-supporting cell membrane in which only the cell membrane was fixed to the substrate from cultured human cells, and succeeded in functional analysis of dysferlin responsible for cell membrane repair. In the future, we will establish a method for concentrating and purifying dysferlin on a substrate.

研究分野：生物物理学

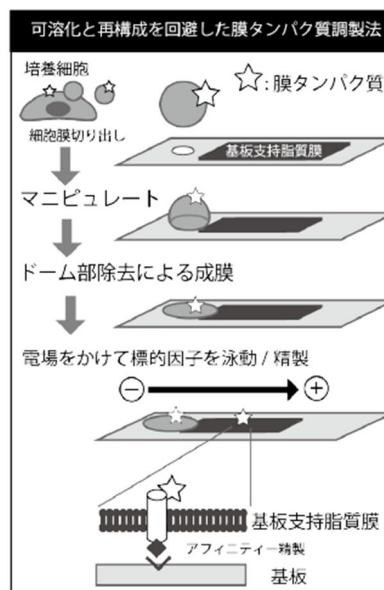
キーワード：膜タンパク質 細胞膜 巨大細胞膜小胞

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は細胞膜の重要な機能を調節、駆動するため、創薬研究における重要な標的タンパク質である。研究開始当初(2017年)のノーベル化学賞に象徴されるように、近年 Cryo-EM による生体分子の構造解析は飛躍的に進展し、これまで困難であった巨大タンパク質複合体や膜タンパク質の構造も次々と明らかにされていた。試験管内で膜タンパク質の機能や構造を解析する場合、細胞試料から標的タンパク質を精製し、リポソームやナノディス等のモデル脂質膜に再構成する。しかし、その膜タンパク質の調製には高い技術と豊富な経験が必要であり、また、細胞内の発現量が多くないため解析に十分な純度と量を得ることが困難であり、膜タンパク質の研究のボトルネックとなっている。この膜タンパク質調製のボトルネックを解消すれば、膜タンパク質研究が飛躍的に加速することは間違いなく、近い将来、DNA シークエンス解析の感覚で、膜タンパク質解析が簡便にできる時代がくることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、標的膜タンパク質を発現したヒト培養細胞から、直接、標的膜タンパク質を基板支持状態の脂質膜(基板支持脂質膜)に移動させてアフィニティー精製する基板を完成させることを目的とした(図)。そして、研究期間内において、解析が困難であった巨大膜タンパク質(Dysferlin)の調製と機能・構造解析に挑戦した。本研究は、既存の方法では調製が困難かつ、生化学的機能・構造説明が疾患の原因説明やからだの仕組みの基本原理解明に大きく貢献が期待される2つの巨大な膜タンパク質(Dysferlin または Piezo)に焦点を絞り、それら膜タンパク質を発現した培養細胞から直接オンチップ上での膜タンパク質の調製方法を確立し、高速 AFM と電子顕微鏡を用いて脂質膜中での標的タンパク質の構造・機能解析を目指した。

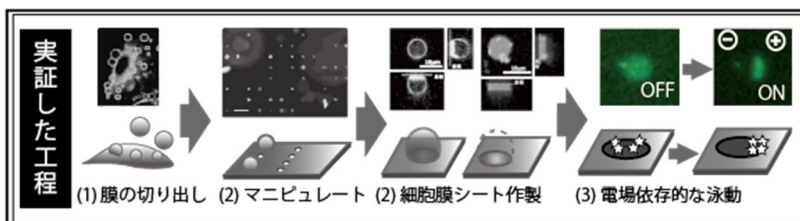


3. 研究の方法

当研究室では、これまでにヒト培養細胞(HeLa, HEK293T, MDCK など)から、小胞状の細胞膜を切り出し、Giant Plasma membrane vesicles (GPMVs)の調製方法を確立してきた(特許第6288635号)。本研究では、このGPMVsを用いて、ガラス等の基板の上に標的の膜タンパク質を含む細胞膜を固定し、標的タンパク質を基板支持膜へ移動させ、濃縮と精製を行うことを検討した。

本研究では、数ある膜タンパク質のなかでも、分子量が大きく精製や構造解析が困難と予測されるタンパク質を選び、その解析に挑戦した。

筋変性疾患ジスフェルリン異常症は、病状の進行に伴い筋力の低下や筋肉の萎縮が生じる疾患である。原因遺伝子である dysferlin は、分子量 24 万の 1 回膜貫通領域を有する巨大膜タンパク質である。Dysferlin は物理的に



細胞膜に穴が空いた場合、破れた膜付近に集積し、膜修復の中心的な役割を担う。細胞内に流入した Ca²⁺依存的に dysferlin の大きな構造変化が予測され、そのダイナミクスの実証が機能解明の一つのポイントである。本研究では、dysferlin を一つの標的タンパク質として、上記の調製方法の検討を行った。

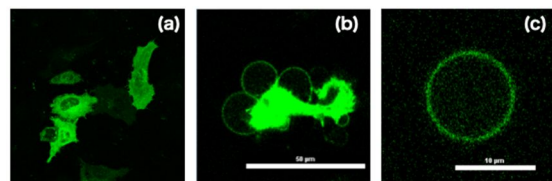
4. 研究成果

【Dysferlin 発現細胞と GPMVs の調製】

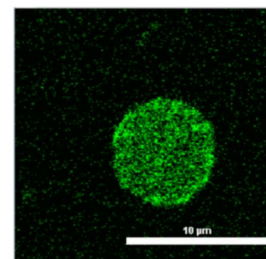
研究開始時点において、当研究室で確立した金属塩を含む緩衝液で処理による GPMVs 作製方法は、ヒト子宮頸癌由来の HeLa と MDCK、Caco-2 細胞を確立していた。発現の確認や物性評価のために、GFP を融合した dysferlin を上記の細胞に導入し発現を検討した。その結果、ヒト胎児腎由来の HEK 293T 細胞と HeLa でのみ、GFP-dysferlin の高発現の条件を見出した (図(a))。その細胞を金属イオン処理液で処理すると、細胞から生じた bleb の膜部分に GFP-dysferlin 由来の蛍光が確認できた (図(b))。さらに、細胞に物理的的刺激 (水流や振動) を与えて、上澄に球状の GPMVs が得られた。それら GPMVs の膜部分にも GFP-dysferlin 由来の蛍光が確認でき、細胞に発現した標的タンパク質の GFP-dysferlin が GPMVs に分配されることを見出した。

【GPMVs 由来の細胞膜の基板固定】

培養細胞から標的膜タンパク質を含む GPMVs の調製に成功し、次にガラス基板上への固定を検討した。HEK, HeLa 細胞からそれぞれ調製した GPMVs を遠心処理でガラス基板上に固定後、超音波処理を施すと細胞膜が基板上に固定できることを確認した。HEK 細胞は細胞から調製できる GPMVs のサイズが小さいためか、基板上に固定できる細胞膜の数が少なく、今後の実験では、HeLa 細胞を用いることとした。



(a) GFP-dysferlinが発現したHeLa細胞
(b) 金属イオン処理でblebが生じた細胞 [white bar 50 μm]
(c) 細胞から切り出したGPMVs [white bar 10 μm]



基板上に固定した
GFP-dysferlinを含む細胞膜
[white bar 10 μm]

【Dysferlin の側方拡散速度の計測と評価】

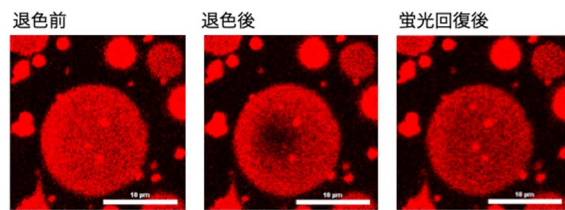
Dysferlin は、細胞膜が物理的に損傷した場合に修復を担うタンパク質である。細胞膜が損傷して細胞外のカルシウムイオンが細胞内に流入し、カルシウム依存的に dysferlin が機能すると考えられている。アミノ配列および *in vitro* の実験から、dysferlin はカルシウム依存的に、細胞膜表面に結合するドメインが複数存在することがわかってきた。膜タンパク質は、細胞膜の脂質二分子膜中を 2 次元的に自由拡散している。カルシウムが細胞外から流入し、dysferlin の細胞膜への結合点が増えると、dysferlin の拡散速度が変わる可能性がある。つまり、カルシウム依存的な dysferlin のコンフォメーション変化が拡散速度の変化として捉えられる可能性があった。そこで、本研究では細胞膜中の dysferlin の側方拡散速度に注目し、その計測方法の確立とカルシウム依存的な拡散速度変化の追跡を試みた。今回、細胞膜中の膜タンパク質の拡散速度計測方法として、Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いた。FRAP は、局所的に強力なレーザーを細胞膜に照射し、標的分子の蛍光を退色し、退色した膜部分に自由拡散で戻る標的分子の速度から、拡散速度を見積もることができる。

[A] 細胞膜中の dysferlin の側方拡散

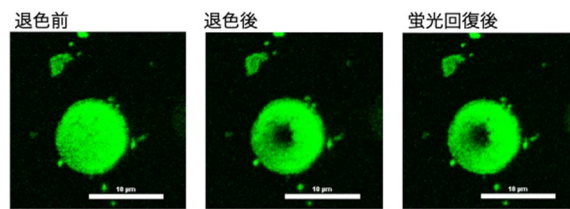
細胞における拡散速度を見積もるために、GFP-dysferlin 発現した細胞を用いて FRAP 計測を行った。その結果、拡散係数 (D) が $0.19 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ であり、膜貫通型膜タンパク質で報告された値と同程度であることがわかった。

[B] 基板支持細胞膜を用いた側方拡散の計測

GPMVs から作製したガラス基板上に固定した細胞膜を基板支持細胞膜と呼ぶ。基板支持細胞膜は $10 \mu\text{m}$ 以下の膜構造体であり、まず、FRAP により、基板支持細胞膜中の脂質分子などの側方拡散速度計測を試みた。その結果、蛍光脂質性分子 DiI の側方拡散係数が $1.09 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ であった。人工脂質で作製した基板支持脂質膜中の蛍光脂質の拡散速度と同程度の値であり、細胞膜中のタンパク質の存在しているが、脂質の拡散速度には大きく影響しないことがわかった。DiI の拡散速度が



基板支持細胞膜中の DiI (蛍光標識脂質) の蛍光回復 [white bar $10 \mu\text{m}$]



基板支持細胞膜中の TfR-GFP の蛍光回復 [white bar $10 \mu\text{m}$]

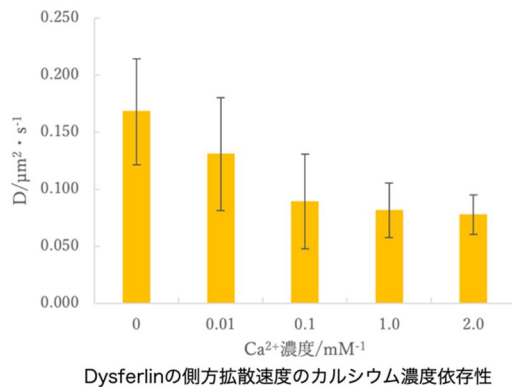
人工脂質膜と同程度であることから、側方拡散速度を評価するに適したモデル膜であることがわかった。同様にアルキル基の palmitoyl 基が GFP に付加した palmitoyl-GFP の拡散速度は、 $0.53 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ であった。palmitoyl-GFP は、蛍光脂質 DiI と比較して拡散速度係数が半分程度に低下した。Palmitoyl-GFP は、palmitoyl 基 (アルキル鎖) を一本で脂質膜に GFP 繫留される分子の形をしており、アルキル鎖 2 本で蛍光団が親水部に位置している。両者の拡散速度の違いは、主として DiI (分子量 933) と palmitoyl-GFP (29,000) の分子量と GFP 嵩高さの違いによるものと考えられる。アルキル鎖の本数の違いがあるが、細胞膜への繫留様式が同じ分子を比較した場合、分子量が大きく嵩高い palmitoyl-GFP の拡散速度が遅いことがわかった。この両者の拡散速度の違いが観測できたことは、本研究の計測条件で、基板支持細胞膜中の分子拡散速度の違いを計測可能であることを意味した。

さらに、細胞膜内在性で複数の膜貫通ヘリックスを有する膜タンパク質・トランスフェリンレセプター (TfR) の拡散を観察した。その結果、蛍光回復が観察されず、TfR は、基板支持細胞膜中で側方拡散をしていない、または非常に遅いことがわかった。拡散しない理由を説明する直接的なデータは、示していないが、TfR はトランスフェリンの結合ドメインが細胞外側に大きく張り出しており、おそらく細胞外のドメインがガラス基板に接触し、側方拡散が妨げられていると考えられた。FRAP を用いて分子構造が明確な 3 つの分子の側方拡散の比較を行ない、基板支持細胞膜における細胞膜を構成する分子の側方拡散特性を明らかにすることに成功した。

[C] 基板支持細胞膜を用いた側方拡散の計測

Dysferlin は、一回膜貫通ヘリックスを有し、そのほとんどのドメインが細胞質側に張り出したトポロジーを有し、複数のカルシウム結合ドメインがフレキシブルな配列を介して数珠繋ぎに配置されている。Dysferlin にカルシウムが結合すると、カルシウム結合ドメイン

が細胞膜表面に結合し、細胞膜との接触面積が多くなるため、速報拡散速度が遅くなることが予測された。Dysferlin のカルシウム濃度依存的な側方拡散速度を比較したところ、カルシウム濃度が高くなると拡散速度が、 $0.17 \pm 0.05 \text{ D}/\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (0 mM) から $0.08 \pm 0.02 \text{ D}/\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (2.0 mM) 遅くなることが明らかとなった。通常、細胞外のカルシウム濃度が 1~2 mM で細胞内が数十 nm であり、細胞膜損傷により生じるカルシウム濃度差のレンジにおいて、拡散速度の変化が観測された。また、カルシウム結合ドメインのみで計測されているカルシウム親和性と同程度の濃度レンジであることから、今回観察されたカルシウム依存的な拡散速度の低下は、dysferlin のコンフォメーション変化によるものと推測された。



以上の結果より、細胞から調製した基板支持細胞膜中にトポロジーを保ったまま dysferlin が分配されること、そしてその機能が保たれていることが明らかとなった。以上の結果は、本研究の主目標である、膜タンパク質の機能を保ったまま、基板支持膜中で濃縮/精製する方法の確立のために大きく前進する成果が得られた。

[D] 電場依存的な標的タンパク質の輸送

基板支持細胞膜を電場内に置くと、細胞膜中の脂質や膜タンパク質が泳動できることは、すでに実証しており、現在、細胞膜試料を電極間にマニピュレートし、基板支持細胞膜が調製できるマイクロ流路を開発している。

[E] 抗体を用いた標的タンパク質の固定

標的膜タンパク質の濃縮/精製には抗体を用いる。基板上に固定した抗体特異的に標的膜タンパク質を結合させ、基板上の特定の位置に目的タンパク質だけを濃縮/精製する。ガラス基板上に抗体を非特異的に吸着し、GFP-dysferlin の側方拡散が止まるか検証したが、基板上の GFP 抗体を介した GFP-dysferlin の固定は FRAP 計測からは、確認することができなかった。今後、抗体の固定方法や密度を改善し、効率的な標的分子の固定方法を確立する。直接的なデータが得られなかったが、調製した GPMVs に GFP 抗体 (一次) および二次抗体を添加した後で、基板支持細胞膜を調製し、FRAP 解析を行なった。先に、GFP-dysferlin に抗体を結合させておき、成膜した形になる。その結果、一次交代と二次抗体を加えた場合、若干の拡散定数の低下が観察された。おそらく結合している抗体の数が少ないことが考えられ、今後、効率よく抗体が標的分子に結合する条件を検討する必要があることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土田修平, 鈴木琢斗, 奥野貴士
2. 発表標題 ヒト培養細胞から基板支持細胞膜を直接作る研究
3. 学会等名 日本生物物理学会 東北支部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------