

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11135

研究課題名(和文)膜タンパク質機能を直接制御する機能性脂質の探索と作用機序の解明

研究課題名(英文)The study of lipid dynamics regulating the activity of membrane proteins

研究代表者

早川 枝季 (Hayakawa, Eri Saki H. Hayakawa)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00383753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はリン脂質アシル鎖に含まれる二重結合数、炭素数の違いが生む膜の側方ストレスなどが、膜の物理因子や共存する膜タンパク質の構造、機能に与える影響について分子レベルで解明することを目的とした。脂質二重層膜はPAPG(16:0-20:4)またはPOPG(16:0-18:1)で作成し、膜中に加えた蛍光分子の分子運動を周波数変換蛍光装置により測定・解析した。その結果、アシル鎖間側方ストレスはPOPGよりもPAPG膜中のほうが弱く、膜タンパク質はPAPGとPOPGとでは異なる再配向性を示した。本研究は膜中の側方ストレスが膜の物理化学的性質やタンパク質の構造、配向性に影響を与えることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の生命活動を支える一つにタンパク質-脂質の相互作用がある。複雑なタンパク質-脂質の相互作用によって生じる現象を解明することは、医学やバイオテクノロジー等において革新的な進展をもたらす可能性がある。本研究は多価不飽和脂肪酸を含むアシル鎖の違いが、異なる膜内側方ストレスや膜カヴァチャーストレスを発生し、その結果、膜タンパク質の構造や機能、人工膜への再配向にも影響を与えることを明らかにしたものである。このような膜の物理化学的性質を理解することは、疾患の発症解明や治療法の開発にも結び付き、私たちの健康や医療に関わる重要な知見を提供するのみならず、生命科学分野での技術の開発にも貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the novel aspects of lateral packing stress/membrane curvature stress, specifically its impact on membrane protein structure and function at the molecular level. In this study, we used POPG (16:0-18:1) or PAPG(16:0-20:4) with mono-different acyl chains as a model system. Fluorescence lifetime and differential polarization measurements of the fluorescence probe DPH, embedded in the membrane, were measured and analyzed using a multifrequency cross-correlation phase fluorometer. The results revealed a lower spatial packing density between lipid molecules in PAPG than in POPG. The lifetime of DPH was shorter in PAPG than in POPG. Moreover, the orientation of the membrane protein exhibited a distinct pattern in PAPG or POPG lipid bilayers. These results demonstrated the impact of lateral packing stress on the physical properties of the lipid membrane, membrane protein structure, and re-orientation pattern, thereby emphasizing the significance of our study.

研究分野：生物物理、細胞生理、健康科学

キーワード：脂質分子 脂質膜 膜側方ストレス 膜カバチャーストレス 多価不飽和脂肪酸 コレステロール チヤネルタンパク質 脂質-タンパク質相互作用

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸はリン脂質やステロールの構成成分であり、二重結合の有無や数により不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸などに大別される。主な脂肪酸の機能として、(A)生命維持のためのエネルギー源(栄養素)、(B)生体を構成する基本単位である細胞や細胞内オルガネラの膜構成成分、(C)生理活性を示す脂質メディエーター、がある。近年、アラキドン酸など、生理活性を示す脂肪酸が脂質メディエーターとして注目されており、炎症や肥満、脂質代謝異常など、さまざまな病態や細胞機能に脂質分子が重要な役割を担っていることがわかってきた。多価不飽和脂肪酸の中でも 3 - 脂肪酸、6 - 脂肪酸はヒト体内で合成することができないため、必須脂肪酸として食事など外部から取り込む必要がある。脂肪酸の摂取によるヒトへの影響として、3 - 脂肪酸、6 - 脂肪酸の摂取によるうつ病の改善(*Biol Psychiatry*. 1998,15;44(4))、高脂血症、動脈硬化、心筋梗塞など循環器疾患の改善(*Int Heart J*. 2015, 13;56(3))、また、動物実験から、3 - 脂肪酸を含む餌を与えられたマウスでは、子供や孫の世代にわたり学習能力が亢進していた(*J. Neurochem*. 2000,75(6))。さらに 3 - 脂肪酸、6 - 脂肪酸の添加により、ニューロンの新生が促進された報告もあり(*Neurosci Res*. 2014,(88))、固体レベルから細胞レベルまで幅広く脂肪酸の影響が明らかにされ始めている。しかし、これらの実験の多くは、脂肪酸を摂取、または添加した実験系や、受容体、各種酵素をノックアウトしたマウスを用いたものがほとんどである。そのため、脂肪酸組成や二重結合の有無、炭素鎖数といった脂肪酸の分子構造の違いによる膜タンパク質の機能制御に関してはまだまだ不明な点が多い。もしこれらの点が分子レベルで明らかにされれば、細胞応答をともなう膜タンパク質に対する活性調節や細胞膜のダイナミクス変化、細胞内情報伝達、神経やホルモン分泌組織における膜融合やベシクル輸送、炎症など、基礎研究から疾患治療を目指した応用研究まで、幅広い学術的研究成果が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、生体や細胞において脂質メディエーターとして注目されている脂肪酸のうち、多価不飽和脂肪酸を念頭に、アシル鎖に含まれる二重結合数や炭素鎖の違いから発生する脂質膜への物理化学的影響について明らかにする。さらに、アシル鎖の違いに誘導された膜の物理化学的变化が、共存する膜タンパク質の構造、活性等に与える影響について分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(A) 脂質膜の各種物理パラメータの測定

今回使用した膜タンパク質がバクテリア由来であることから、リン脂質はバクテリアの細胞膜の主要リン脂質である Phosphatidylglycerol(PG)を選択した。アシル鎖は 1 本のみ2重結合数が異なる 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1 -rac-glycerol) (POPG:16:0, 18:1) と 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1 -rac-glycerol)(PAPG:16:0, 20:4)を用いた。膜の物性測定のため蛍光分子;1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を POPG または PAPG に混ぜて脂質二重層膜を作成し、周波数変換蛍光装置:ChronosDFD multifrequency cross-correlation phase fluorometer (ISS, Inc.)を用いて DPH の蛍光寿命、偏光性、分子運動などを測定し BRD model で解析した。脂質二重層膜は DPH を含む POPG または PAPG 多重層膜をエクストルーダー処理(100nm ポアサイズ膜)により作成した。

(B) タンパク質の脂質膜への再配向試料を用いた実験

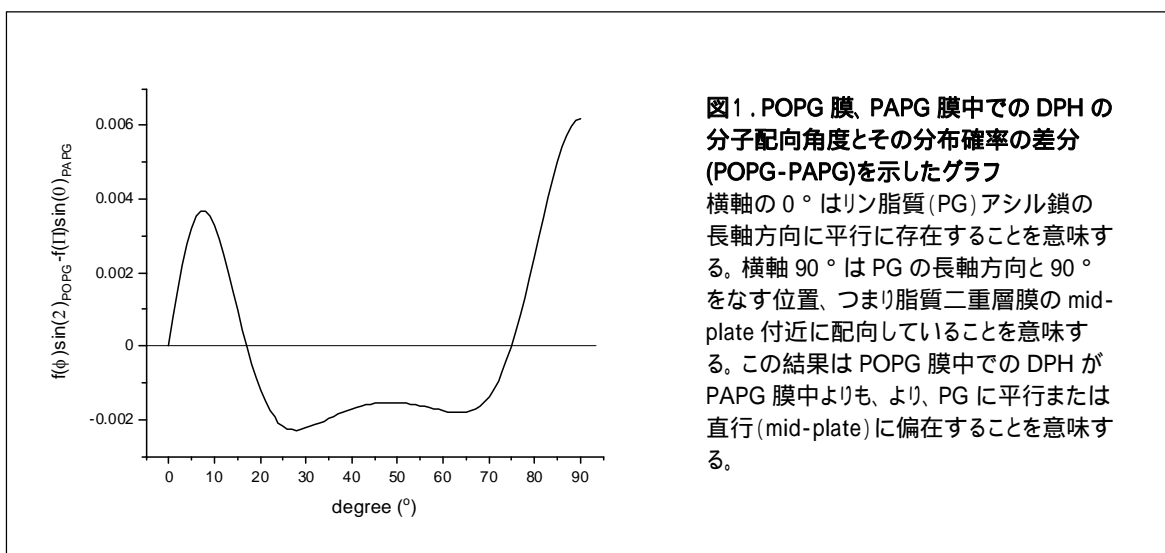
実験に用いた膜タンパク質は、構造、機能がよく調べられている pH 依存性 K⁺チャンネルタンパク質; KcsA を用いた。KcsA を POPG 膜、または PAPG 膜に再配向させ、タンパク質の向きをウェスタンブロットティングにより検討した。また蛍光標識した KcsA を POPG 膜または PAPG 膜に再配向させ、KcsA 構造の違い(開閉の違い)に起因する蛍光強度変化を蛍光計で測定した。脂質二重層膜に KcsA を再配向させた試料は、KcsA-POPG、KcsA-PAPG の混合液をエクストルーダー処理(100nm ポアサイズ膜)により作成した。

4. 研究成果

(A) アシル鎖中の二重結合数の違いによる脂質膜の物性変化

POPG、PAPG 膜のアシル鎖領域の分子運動、脂質間パッキングストレスなどについて DPH の分子運動を指標として解析した。DPH は棒状の蛍光分子でリン脂質膜のアシル鎖領域に存在し、リン脂質膜のアシル鎖の分子運動やその領域環境を反映する。測定結果から、DPH の蛍光寿命は PAPG 膜中のほうが POPG 膜中よりも短く、DPH が脂質膜アシル鎖領域間で動ける「自由度」は、PAPG 膜のほうが POPG 膜よりも大きかった。さらにリン脂質分子に対して平行、または直行方向の DPH の回転速度を POPG 膜、PAPG 膜それぞれで測定した結果、PAPG 膜中のほうが POPG 膜よりも速かった。

つぎに POPG 膜または PAPG 膜中に存在する DPH 分子の分布角度とその存在比を解析した(図 1)。その結果、PAPG 膜中では DPH は脂質分子に対して約 17-75° 付近、POPG 膜中では 0-17° と 75-90° 付近により多く分布していることがわかった。



(B) KcsA に対するアシル鎖中の二重結合の影響

POPG、PAPG 膜に再配向させた KcsA の向きを調べるため、キモトリプシン処理した KcsA-POPG、KcsA-PAPG を用いてウェスタンブロットングにより明らかにした。その結果 KcsA-POPG では KcsA は外向き、内向きの両方向に配向していたが、KcsA-PAPG では一方向のみに配向していることがわかった。さらに POPG または PAPG に配向させた KcsA の開閉構造は、PAPG 膜中のほうが POPG 膜中よりも、より開いた構造を取っていることが分かった。

以上の結果から、脂質膜中に発生するアシル鎖間側方ストレスは POPG 膜のほうが PAPG 膜よりも強く、脂質分子アシル鎖領域の運動性は PAPG 膜のほうが高かった。これらの物理的性質が結果として KcsA が POPG 膜で外側、内側の両方向に配向したと考えられる。本研究はアシル鎖中の二重結合数の違いが膜の側方ストレスを変化させ、膜の物理化学的性質やタンパク質の構造、配向性に影響を与えることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Junpei Fukumoto, Minako Yoshida, Suzumi M Tokuoka, Eri Saki H Hayakawa, Shinya Miyazaki, Takaya Sakura, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Jiro Usukura, Hideo Shindou, Fuyuki Tokumasu	4. 巻 -
2. 論文標題 Pivotal roles of Plasmodium falciparum lysophospholipid acyltransferase 1 in cell cycle progression and cytosome internalization	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.01.13.575495	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Eri Saki H Hayakawa, Misuzu Ueki, Elmukhtar Alhatmi, Shigetoshi Oiki, Fuyuki Tokumasu, Drake C Mitchell, Masayuki Iwamoto	4. 巻 1866(6)
2. 論文標題 Different lateral packing stress in acyl chains alters KcsA orientation and structure in lipid membranes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184338-184347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2024.184338.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fuyuki Tokumasu, Eri H Hayakawa, Junpei Fukumoto, Suzumi M Tokuoka, Shinya Miyazaki	4. 巻 83
2. 論文標題 Creative interior design by Plasmodium falciparum: Lipid metabolism and the parasite's secret chamber	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102369,102376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Eri H Hayakawa, Hirotomo Kato, Glenn A Nardone, Jiro Usukura	4. 巻 80
2. 論文標題 A prospective mechanism and source of cholesterol uptake by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes co-cultured with HepG2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayakawa EH, Yamaguchi K, Mori M, Nardone G.	4. 巻 17;10(1)
2. 論文標題 Real-time cholesterol sorting in Plasmodium falciparum-erythrocytes as revealed by 3D label-free imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 2794, 2805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59552-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計14件(うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 早川枝李、植木美鈴、Elmukhtar Alhatmi、老木成稔、徳舩富由樹、 Drake C. Mitchell、岩本真幸
2. 発表標題 膜構成リン脂質アシル鎖領域に発生するパッキングストレスと 膜タンパク質との相互作用に対する生物物理学的解析の確立
3. 学会等名 第93回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Eri Saki H. Hayakawa, Misuzu Ueki, Elmukhtar Alhatmi, Shigetoshi Oiki, Fuyuki Tokumasu, Masayuki Iwamoto, Drake C. Mitchell
2. 発表標題 The effect of different lateral packing stress in acyl chains on KcsA orientation and structure in lipid bilayer
3. 学会等名 21st IUPAB Congress (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 早川枝李
2. 発表標題 タンパク質の活性にたいする“膜力バチャーストレス”の影響 ~あなたの知らない脂質(膜)の世界~
3. 学会等名 第28回 分子寄生虫学ワークショップ/第18回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川 枝李
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内におけるコレステロールの動態イメージング
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri H. Hayakawa, Hiroto Kato, Glenn Nardone, Jiro Usukura
2. 発表標題 Real-time Imaging of Cholesterol Sorting in <i>P. falciparum</i> -erythrocytes by Label-free Holotomographic Microscopy
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri H. Hayakawa
2. 発表標題 The survival tactics of <i>Plasmodium falciparum</i> in erythrocytic stages
3. 学会等名 Invited seminar; The Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri H. Hayakawa
2. 発表標題 Label-free Holotomographic Microscopy reveal Cholesterol Sorting Occurred in <i>Plasmodium falciparum</i> -erythrocytes
3. 学会等名 KAIST e-workshop on Quantitative Phase Imaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri H. Hayakawa, Tokumasu F., Usukura J., Nardone G., Kato H., WelIems TE.
2. 発表標題 Real-time Imaging of Cholesterol Sorting in P. falciparum-erythrocytes by Label-free 3D Holotomographic Microscopy
3. 学会等名 The 10th Jichi Medical University International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri H. Hayakawa, Glenn Nardone , Kentaro Yamaguchi , Hiroyuki Matsuoka, Hiroto Kato, Masahiro Mori, Jiro Usukura
2. 発表標題 Observation of cholesterol sorting in P. falciparum-erythrocytes by 3D label-free Holotomographic imaging
3. 学会等名 ASCB (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川枝李
2. 発表標題 赤内期における熱帯熱マラリア原虫のコレステロールの取り込みと赤血球内輸送についての解明
3. 学会等名 分子寄生虫マラリアフォーラム
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
研究協力者	岩本真幸 (Iwamoto Masayuki)	福井大学・医学部・教授 (13401)	

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			
米国	Portland State University			