

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22257

研究課題名(和文) 生体膜のドメイン形成における脂質アンカーや微量脂質の役割

研究課題名(英文) Roles of lipid anchors and minor components in domain formation in biomembranes

研究代表者

村田 道雄(Murata, Michio)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本萌芽的研究では、化学的手法によって生体膜のドメイン形成におけるタンパク質の脂質アンカーや微量脂質の役割を調べた。生体膜に生ずる脂質ラフトなどのドメインでは、微量脂質が未知のメカニズムでドメイン形成を惹起することも知られているが、化学的研究例はわずかである。本研究では、この例として、タンパク質キナーゼであるLynのN末端付近に導入された2つのアシル鎖が脂質膜に結合する場合、ドメイン形成に関して数mol%しか存在しない希少脂質が影響を与える場合、この2例についてモデル脂質二重膜を用いてアシル鎖や希少脂質の運動性を詳細に測定した。その結果、アシル鎖の運動性とドメイン形成について興味深い結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳後修飾によってタンパク質に導入された少数のアシル鎖や数mol%しか存在しない希少脂質がドメイン形成など膜の相状態に与える影響については、今まで精密な測定がなされていなかった。本研究では、2本のアシル鎖が結合したタンパク質キナーゼLyn、および糖鎖を有する希少脂質に着目して、膜物性に与える影響を明らかにすることができた。すなわち、学術的意義としては、生物・医学分野で盛んに行われている生体モデル膜系の実験において、希少脂質の影響が無視できないことを定量的に示めすことによって、膜組成を決める上での指針をある程度示すことが出来たと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the role of protein lipid anchors and trace lipids in the domain formation of biological membranes by chemical methods. In domains such as lipid rafts occurring in biological membranes, it is also known that trace lipids induce domain formation by an unknown mechanism, but there are few examples of chemical studies. In this study, as an example of this, when two acyl chains introduced near the N-terminal of Lyn, a protein kinase, bind to a lipid membrane; and when a trace lipid present in only a few mol% affects domain formation, For these two cases, the motility of acyl chains and rare lipids was measured in detail using a model lipid bilayer membrane. As a result, interesting results were obtained on the motility and domain formation of the acyl chains.

研究分野：生物物理化学

キーワード：脂質ラフト アシル化タンパク質 翻訳後修飾 境界脂質 マイクロドメイン

1. 研究開始当初の背景

細胞間の情報伝達に、脂質が形成するドメイン構造が重要な役割を果たしていることが分かってきた。例えば、細胞膜を介した情報伝達を担う脂質ラフトは特定の脂質が集合したドメインと考えられているが、脂質修飾タンパク質や糖脂質・ガングリオシドなどの脂質部位が少量結合することによってラフト形成が大きな影響を受ける例が知られるようになった。具体的には、タンパク質に1～3本の脂肪酸やファルネシル基が結合することによって、生体膜に対する結合親和性が調整されており、さらには、GPI アンカータンパク質のように膜上のドメイン(図1、脂質ラフトなど)への局在性がこれらの脂質修飾によって制御されている。また、脂質ラフトを形成するリン脂質は、生体膜の主要成分であるスフィンゴミエリンだけではなく、ガングリオシドや他の糖脂質も特徴的なドメインを形成することが報告されている。一方で、これらの微量脂質がどのような機構でドメインを形成しているかについては、不明な点が多い。これに限らず、微量脂質の役割は、その生物学的重要性にも拘わらず、化学的研究が遅れている。われわれは、生体膜に生ずるドメイン構造は、主要成分である膜脂質が相図に従って分布する場合と、微量脂質が未知のメカニズムでドメイン形成を誘起する場合に分けて研究しなければならないことに気付き、特に後者に焦点を当てるために本研究を立案した。

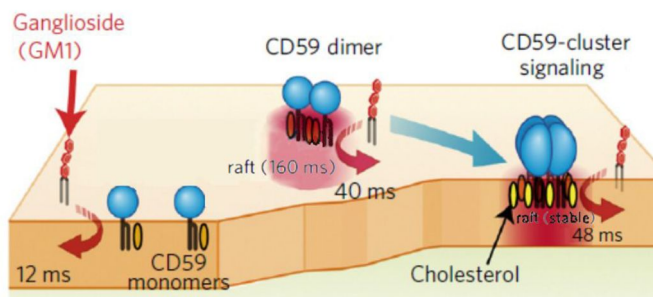


図1. GPI-アンカータンパク質・CD59は、2本の飽和アシル鎖を持つが、二量化・多量化することによってGM1が局在する短寿命の脂質ラフトを形成する。CD59の少数のアシル鎖が細胞膜の相状態を変化させることが分かってきた。曲がった矢印とその下の数字はGM1の脂質ラフトへの局在とその平均滞在時間を示す。(Komura et al. Nat. Chem. Biol, 2016, 12, 402より改変・転載)

2. 研究の目的

本研究ではアシル化タンパク質の脂質部位や微量脂質が膜に結合することによって生じる脂質ラフト・ドメイン構造に焦点を絞り、これらの疎水性部位についての情報伝達を担うタンパク質キナーゼである Lyn のモデルペプチドと同位体標識脂質を化学合成し、分光学的方法によってそのメカニズムを解明することを目的とした。また、生体膜に微量含まれるステロールとして、糖化コレステロール(cholesteryl glucoside)とその類縁体に着目し、また、二本鎖脂質の例として糖化セラミドに着目し、これら脂質が二重膜の物性に与える影響を精査することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

脂質修飾タンパク質のアシル鎖が、脂質二重膜に結合してドメイン形成に影響を与える状態として、以下の2つの可能性が考えられる(図2)。1)少数のアシル鎖が間隔を置いて脂質膜のなかに配列する場合、2)ドメインの境界面にアシル鎖が局在し、ドメイン間の線張力を変化させる場合。このうち1)については、ヘッドグループに相当する部分に Lyn のN末端ペプチドを用いた。ドメイン境界に局在・配列する場合2)については、糖脂質や糖化ステロールを用いた。これらは、より複雑な脂質修飾タンパク質や糖脂質のモデルとしてデザインされており、ヘッドグループの大きさや極性をペプチドや糖鎖を加減することによってモデル化合物として多様な機能を担わせることができる。

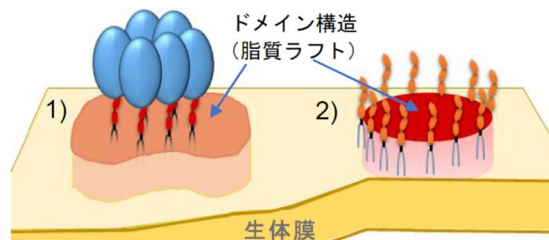


図2. 1) 少数のアシル鎖が一定の間隔を置いて脂質膜のなかに配列するアンカータンパク質の場合。まず、モデル化合物を用いて脂質修飾タンパク質の状況を再現することを試みる。2) ドメインの境界面に糖脂質などのアシル鎖が局在してドメイン間の線張力を変化させる場合。ヘッドグループの選択が重要であるのでペプチド鎖や糖鎖の置換体を用いて、NMR測定によってドメイン形成等を評価した。

これらモデル分子の結合によって生体モデル膜(脂質二重膜)が受ける影響については、主に重水素および炭素-13 標識脂質の固体NMRと蛍光標識脂質の蛍光寿命を用いて評価する。具体的には、モデル化合物を少量

添加した時のドメインの形成とその膜物性の変化を、ドメイン局在性脂質(スフィンゴミエリン)の重水素 NMR シグナルから得られるアシル鎖の揺らぎを指標として評価する。また、実際の脂質修飾タンパク質によって形成されたドメインとの比較については、蛍光脂質プローブの拡散速度の変化を指標にする。研究期間終盤では、生体膜イメージング実験においてこれらモデル化合物と脂質修飾タンパク質を比較する必要が生じるが、一分子観察の研究者との共同研究によって細胞膜由来リポソームを用いた実験を行う予定である。

4. 研究成果

アシル鎖が2本結合したタンパク質として Lyn に着目した。Lyn は Src ファミリーキナーゼの一種であり、細胞膜内葉の固いドメインに分配されて情報を伝達する。そのモデルとして、脂肪酸2種類が結合した Lyn のN末端ペプチドを化学合成し、重水素を置換したミリスチン酸を導入した。重水素の信号を固体NMRによって観測した結果、周囲の膜脂質に比べて Lyn のミリスチン酸は周囲の膜脂質との相互作用が低いことが判明した。

希少脂質の例として、グルコースの結合したコレステロールおよび糖化セラミドに着目した。主に固体 NMR 測定によって、希少脂質が与える膜物性への効果やドメイン形成能について調べた。その結果、通常の膜脂質にはない特殊な効果が数モル%の添加でもたらされることが分かり、これら希少脂質が生体膜成分として膜物性に与える影響の重要性を明らかにすることができた。

具体例として、糖化コレステロール少し詳しく述べる(雑誌論文 Hanashima et al を参照)。コレステリル- β -D-グルコシド(ChoGlc)は、脳組織で発現する哺乳類の糖脂質である。脂肪鎖に対するコレステロール(Cho)の秩序化効果と脂質相互作用に対するグルコースの置換の影響を、脳に豊富に存在するN-ステアロイルスフィンゴミエリン(SSM)で構成される脂質二重膜で調べた。示差走査熱量測定により、ChoGlcはChoと同程度にSSMと分子的に混和することが明らかになった。重水素化SSMの固体 ^2H NMRは、Choのグルコシル化がステロールの効果を大幅に低下させることを示した。SSM鎖の順序に関するステロール四環性コアの配向は、重水素化およびフッ素化されたChoGlc類似体の固体NMR分析によってさらに調べた。ChoGlcは、SSM二重層のChoよりも長分子軸(C3~C17)と膜法線との傾斜角が小さく、傾斜角の変動は、SSMアシル鎖の温度依存性移動度変化の影響をほとんど受けない。ChoGlcのステロールコアの配向から、ステロール部分とSSMの相互作用は弱いことが分かった。MDシミュレーションの結果は、Glc部分がSSM-ステロール相互作用を阻害し、親水性グルコース部分がSSMのアミド基と同じ深度に存在するため、SSMのヘッドグループのアンブレラ効果が低下していることが示唆された。したがって、ChoとChoGlcの分布と局在化は、生体膜の特定の場所で短時間に発生するスフィンゴミエリンを主体としたドメインの消長を制御している可能性があると考えられる。

このように、今回の萌芽的研究によって少量の脂肪鎖が顕著に脂質二重膜の物性を変化させることが分かり、今後の生体膜物性の研究に役立つ研究成果が得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinya Hanashima, Nanami Fukuda, Raymond Malabed, Michio Murata, Msanao Kinoshita, Peter Greimel, Yoshio Hirabayashi.	4. 巻 1863
2. 論文標題 -Glucosylation of Cholesterol Reduces Sterol-Sphingomyelin Interactions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBA - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183496	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 -

1. 著者名 Joan C Ondevilla, Shinya Hanashima, Akane Mukogawa, Yuichi Umegawa, Michio Murata.	4. 巻 36
2. 論文標題 Diosgenin-induced physicochemical effects on phospholipid bilayers in comparison with cholesterol.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.127816	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高地 愛、梅川 雄一、村田 道雄
2. 発表標題 膜タンパク質および周辺リン脂質二重膜の深度依存的な水和状態の評価
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大田 英和、梅川 雄一、花島 慎弥、土川 博史、村田 道雄
2. 発表標題 水和脂質膜の固体NMR測定による高度不飽和脂肪酸結合リン脂質の分子機構の解明
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友田 千尋、矢野 陽、花島 慎弥、河村 奈緒子、安藤 弘宗、村田 道雄、Erwin London
2. 発表標題 蛍光スフィンゴ脂質プローブを用いたモデル膜中でのスフィンゴ脂質ドメイン構造のFRET解析
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

村田研究室HP http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/
--

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
---------	---------