

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770122

研究課題名(和文) 脂質ラフト局在膜タンパク質の三次元構造とその膜小胞形成機構の解明

研究課題名(英文) Three-dimensional structure of lipid-raft localized membrane protein and elucidation of the mechanism forming membrane vesicles

研究代表者

横山 英志 (YOKOYAMA HIDESHI)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：70433208

研究成果の概要(和文)：生体膜中の小胞形成に関与するタンパク質、ストマチンやフロチリンは脂質ラフトという脂質中の集合領域に存在しているが、どのように機能しているかは明らかになっていない。そこでヒトのストマチンやフロチリンの立体構造を決定することで機能の解明を目指した。大腸菌を用いることでこれらタンパク質を大量に得ることに成功した。続いてタンパク質の結晶を得ることができれば立体構造の決定が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Stomatin and flotillin, which are involved in forming membrane vesicles, are located in lipid rafts. Until now, it is not elucidated how these proteins function. I tried to prepare proteins, human stomatin and flotillin using *Escherichia coli*, and to determine three-dimensional structures in order to elucidate their functions. I succeeded to get these proteins. And if I can get crystals of these proteins, I will determine the structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：タンパク質構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膜小胞、ストマチン、フロチリン、脂質ラフト、結晶化、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体膜の小胞が別の膜と融合し積み荷として膜成分や水溶性分子を運ぶ膜小胞輸送は、細胞が細胞膜を介して外部から物質を摂取したり、細胞内部で合成されたタンパク質や脂質を細胞外に運び出す上で重要である。膜タンパク質ストマチンは、ほとんど全ての生物種に保存され、そのヒトにおける欠損は遺伝性有口赤血球症の発症の原因となる。ストマチンは脂質ラフトに局在しイオンチャネルやトランスポーターの制御因子と報告されている。最近、赤血球の貯蔵中に生じる膜小胞中にストマチンが多量に含まれることが報告され、これはストマチンが膜小

胞形成に関与することを示している。

(2) 研究代表者は超好熱菌由来ストマチンのコアドメインの結晶構造を初めて決定した。決定した構造は三量体で一辺の長さ 50 オングストロームの中心の三角形とその各頂点から伸びる一辺 60 オングストロームの長いヘリックスからなる全く新規の構造を示した。中心の三角形領域は、核磁気共鳴法により単量体の溶液構造が決定されたマウスのフロチリンと部分的に類似した構造であった。フロチリンはエンドサイトーシスの制御因子であり膜小胞輸送との関連することも報告されている。ス

トマチンやフロチリンはいずれも脂質ラフトに存在し膜小胞形成との関連が示唆されるだけでなく、多量体を形成して足場タンパク質として機能すると考えられるなど共通する点が多い。

2. 研究の目的

(1) ストマチンやフロチリンは共通の性質を持ち膜小胞輸送の機能を示すと考えられる。研究代表者がすでに構造決定した超好熱菌由来ストマチンはヒトのストマチンとアミノ酸配列の相同性が40%程度と比較的高いためヒトにおける構造と類似していると予想されるものの構造は未だ不明である。また決定した構造は多量体形成領域を除いた構造であるため、その多量体構造についても解明されていない。またマウスのフロチリンの単量体構造が決定されているがフロチリンも多量体を形成すると報告されておりその多量体構造も未だ不明である。

(2) 脂質ラフト局在膜タンパク質ストマチンもしくはフロチリンの多量体構造をX線結晶構造解析により初めて決定しこれらタンパク質による膜小胞形成機構を解明することを目的とした。これらタンパク質は多量体を形成し脂質ラフトの足場タンパク質として機能すると考えられるが、その機能はいまだ解明されておらず、これらの多量体構造を決定することで、膜小胞形成機構の解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) 市販のHela細胞からRNAを抽出し逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によりヒトのcDNAを得た。次にヒトのストマチン、フロチリンの遺伝子断片を増幅するため、ヒト遺伝子データベース (<http://www.h-invitational.jp/hinv/ahg-db/index.jsp>) を利用し、タンパク質のアミノ酸配列と遺伝子配列情報を得て、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)反応のためのプライマーを適宜設計した。増幅した遺伝子断片を制限酵素処理した後に発現用プラスミドに挿入し、全長プラスミドを得た。次にそれらのタンパク質のアミノ酸配列情報から二次構造予測プログラム (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を利用してタンパク質のコアドメインを予想した。ヘリックスやストランドと予測される部位の間のループ部分を末端とするように、アミノ末端とカルボキシ末端を定め、そのようなフラグメントをストマチンについては数通り考案した。そして各タンパク質の全長プラスミドをPCR反応の鋳型とすることで同様の手法により

各フラグメントのプラスミドを得た。

(2) 作製したプラスミドを用いて大腸菌株を形質転換した。その際大腸菌で低頻度のコドン補うためのトランスファーRNA遺伝子が導入されており高レベルのタンパク質発現が見込まれる大腸菌株を使用した。これらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し大腸菌の培養、誘導後に菌体を回収した。組換え大腸菌からの目的タンパク質の発現と精製はほぼ定法に従った。大腸菌の菌体を超音波破碎後の遠心沈清について2段階のカラムクロマトグラフィー操作により精製した。すなわちヒスチジンタグの付与されるプラスミドを用いているので、ニッケル親和性樹脂を用いたアフィニティ精製で効率よく精製した。さらにクロマトグラフィーシステムを用いイオン交換クロマトグラフィーを行って精製の純度を高めた。

(3) 得られた精製タンパク質を用いて、蒸気拡散法による結晶化を行った。結晶化条件のスクリーニングにはHampton Research社製のCrystal Screen IとIIおよびMemb facを用いた。

4. 研究成果

(1) ストマチンについては全長を含め計5通り、フロチリンについては全長を含め計3通りのプラスミドを作製した。これらのプラスミドを用いて組換え大腸菌の培養、誘導、菌体回収、超音波破碎を行い、目的タンパク質の発現を電気泳動により確認したところ、フロチリン全長を除く7種類について目的タンパク質が大量に発現していることを確認す

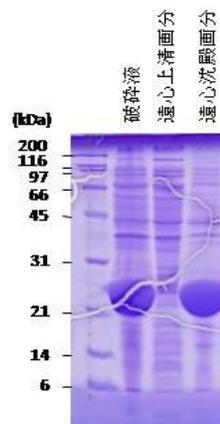


図1 電気泳動図
37度、0.5 mM IPTG誘導

ることができた。しかしいずれも超音波破碎後の遠心沈殿画分に目的タンパク質が得られており、遠心上清画分には得られなかった。図1にストマチンのコンストラクト1についての電気泳動図を示す。

大部分の目的タンパク質が遠心沈殿画分に得られたのは、タンパク質の生成速度が早く封入体となって本来の高次構造をとったタンパク質がほとんど得られていないためと考えられた。

(2) そこでそれぞれのコンストラクトについて大腸菌の培養温度を37度から20度下げ、タンパク質の誘導剤イロプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) の濃度を0.5 mMから0.1 mMに下げることによってタンパク質をゆるやかに発現させることを検討した。その結果、遠心上清画分にバンドが得られるようになった。しかし遠心沈殿画分中のバンドが依然として多く、全体の発現量も減少した。図2にストマチンのコンストラクト1についての電気泳動図を示す。

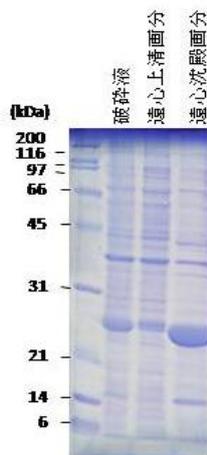


図2 電気泳動図
20度、0.1 mM IPTG誘導

(3) そこで次に超音波破碎後の遠心沈殿画分に1~2 Mの尿素を添加してタンパク質の高次構造を部分的にほどいた後、透析により段階的に尿素の濃度を下げることでタンパク質の高次構造を再構成することを試みた。図3にストマチンのコンストラクト1についての電気泳動図を示す。尿素を添加することで遠心上清にバンドが得られ、透析で尿素を段階的に除いた後も大部分を遠心上清画分に得ることができた。得られたサンプルについてニッケルアフィニティ精製を行うことにより、単一のバンドが得られるまで精製を行うことに成功した。

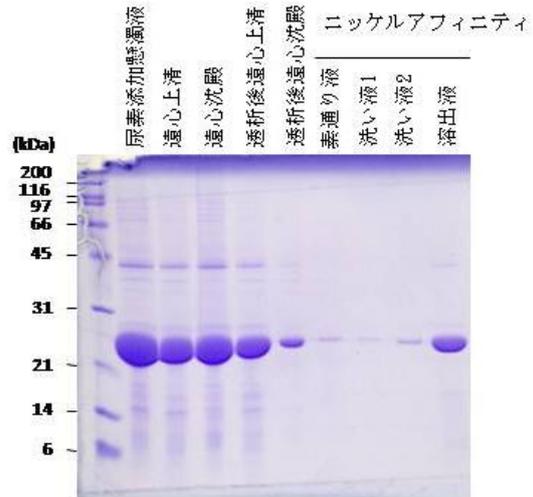


図3 電気泳動図
2 M 尿素処理、透析、ニッケルアフィニティ精製

(4) 上記のようにして得られた精製サンプルを用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件の探索を行った。現在のところX線解析に適した良質な結晶は得られていない。

(5) 次にさらに低温でタンパク質の誘導が可能な発現用プラスミドを用いることで目的タンパク質の発現と精製を検討した。(1)と同様の手法でプラスミドを作製し、組換え大腸菌の培養後、誘導を15度で一晩行い、菌体回収、超音波破碎を行い、目的タンパク質の発現を電気泳動により確認した。超音波破碎後の目的タンパク質の遠心沈殿画分に対する遠心上清画分の割合は増加したものの、発現量が極端に減少したため、結晶化用の精製サンプルを得ることができなかった。

(6) 新たに目的タンパク質の可溶性を高めるため融合タンパク質による発現系の調製を現在試みている。ストマチンとフロチリンのアミノ末側にマルトース結合タンパク質を付加させたプラスミドを作製した。作製したプラスミドを用いて大腸菌でのタンパク質発現を試みている。最近ストマチンの属するSPFHファミリータンパク質で大腸菌発現系を用いてマルトース融合タンパク質を可溶性画分に安定に精製したとの報告があったことから、ストマチンにおいても可溶性画分を安定して得ることができると期待できる。これにより安定な精製サンプルを得ることができれば、結晶化条件の探索を行い、構造解析に取り組むことが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① 横山英志、膜タンパク質ストマチンの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼの機能、*YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 1289-1293 (2010)、査読有

② Yohta Kuwahara, Satoru Unzai, Takashi Nagata, Yoko Hiroaki, Hideshi Yokoyama, Ikuo Matsui, Takahisa Ikegami, Yoshinori Fujiyoshi, Hidekazu Hiroaki, Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*, *Biophys. J.*, **97**, 2034-2043, (2009), 査読有

[学会発表] (計16件)

① Hideshi Yokoyama, X-ray crystal structure and function of 1510-N protease specific for stomatin from *P. horikoshii*, JST-CNRS Joint Seminar 2010, 2010年9月22日, Paris, France

② 横山英志、藤井敏、松井郁夫、膜タンパク質ストマチンの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼの機能、日本薬学会 第130年会、2010年3月29日、岡山

③ Hideshi Yokoyama, X-ray crystal structure of stomatin from *P. horikoshii*, JST-CNRS Joint Seminar 2009, 2009年10月30日, Tsukuba, Japan

④ 横山英志、膜タンパク質ストマチンの特異的切断プロテアーゼの二量体構造、静岡県立大学 2008 US フォーラム、2009年8月5日、静岡

⑤ 横山英志、膜タンパク質ストマチンの三次元構造、第55回日本薬学会東海支部総会・大会、2009年7月11日、名古屋

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ストマチン欠失変異体
発明者：松井郁夫、横山英志
権利者：独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特開 2009-143857
出願年月日：2007年12月14日

(公開年月日 2009年7月2日)

国内外の別：国内

○取得状況 (計1件)

名称：新規耐熱性プロテアーゼ
発明者：松井郁夫、横山英志
権利者：独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特許第4431722号
取得年月日：2010年1月8日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bukka/yokoyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 英志 (YOKOYAMA HIDESHI)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：70433208