

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510231

研究課題名（和文）膜蛋白質の自己集積はアンカーペプチドのゆらぎと自己組織化が支配する

研究課題名（英文）Self-assembly of a membrane protein governed by the fluctuation of the anchor peptide and the self-organization.

研究代表者

泉 俊輔（SHUNSUKE IZUMI）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90203116

研究成果の概要（和文）：

膜貫通蛋白質の生体内における機能解明にはそれらの持つ揺らぎの情報が不可欠である。そこで、メリチンをモデルペプチドとしてリン脂質膜との相互作用を質量分析法と単分子膜の膜厚測定を用いて評価した。その結果、ある温度で膜外への突出を繰り返すメリチンの突出速度がアレニウスの法則に従わなくなる事が示された。この現象は、温度上昇により活発化された脂質分子が膜外への突出を制限するためであり、メリチンの割合が高くなるほど脂質膜の不安定化によりその制限が増加する事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Information on the fluctuation of protein is important to elucidate the function of the penetration of proteins on the biomembrane.

The interaction between phospholipid and melitin molecules as a mode peptide was evaluated by the mass spectrometry for the liposome.

As a result, the relationship between the permeability of melitin through the membrane and the temperature was well fitted by the Arrhenisu law.

These experimental results suggest that melitin molecules enhances the instability of the lipid membrane due to the higher permeability which is related to the specific chemical structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：質量分析

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アンカーペプチド、ゆらぎ、自己組織化、トポロジー、膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

リン脂質膜内でのメリチンのアセチル化は、低温領域ではアレニウス挙動を示すが、高温

になると非アレニウス挙動を示すことが明らかになった。この非アレニウス挙動は、粗視化動力学シミュレーションの結果と併せ

て考えると、温度上昇に伴いリン脂質の動きが活発になり、リン脂質がメリチンの「浮き」のような動きを妨げることに起因すると推測した。

## 2. 研究の目的

生体反応を司るタンパク質は熱ゆらぎや分子内および分子間の相互作用の変化を伴うゆらぎを受けて機能している。膜タンパク質の場合、そのタンパク質が受ける相互作用には膜からの相互作用も含まれるため、水溶液中で働くタンパク質が持つゆらぎとは大きく異なる。質量分析法を用いて膜貫通ヘリックスのゆらぎを解析する。

## 3. 研究の方法

一般に質量分析法は質量情報しか得ることができないが、質量分析法を有機化学的手法と組み合わせることで分子の性質を変えずに構造情報やゆらぎの情報を得ることができる。本研究では質量分析法に *N*-hydroxysulfosuccinimidyl acetate (NHSSAc)を用いたアセチル化修飾法を組み合わせることで、膜上における構造（膜トポロジー）とそのゆらぎ（膜内ダイナミクス）を解析した。生体膜のモデルとしてホスファチジルコリンにより構成されたリポソームを作成し、これにメリチンを加え、NHSSAcによりアセチル化した後、MALDI-TOF 質量分析計により MS 測定した。

その結果、 $m/z$  2888 に新たなピークが観測された。メリチンの分子量は 2845 であるので、 $m/z$  2888 は 1 ヲ所アセチル化されたメリチンのプロトン付加分子に帰属された。この 1 ヲ所アセチル化された部位を同定するために、MALDI-QIT-TOF 質量分析計を用いた MS/MS 測定した。その結果、そのアセチル化部位は主鎖のアミノ基であることが示された。これらの結果から、メリチンはリポソームに埋まるとき N-末端を膜外に向けた構造をとることが明らかになった。

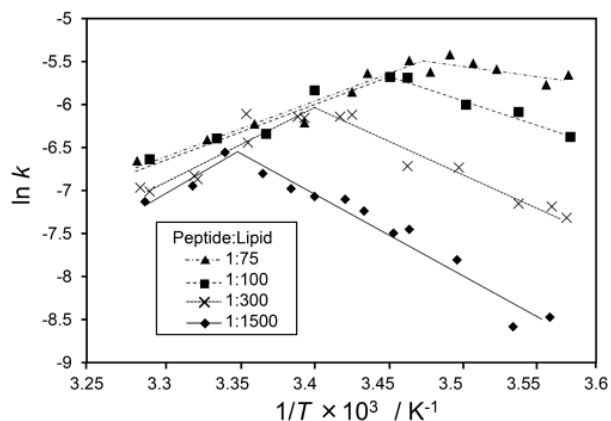


図1. DMPCリポソームにおいてメリチンの割合を変化させたときのアレニウスプロット

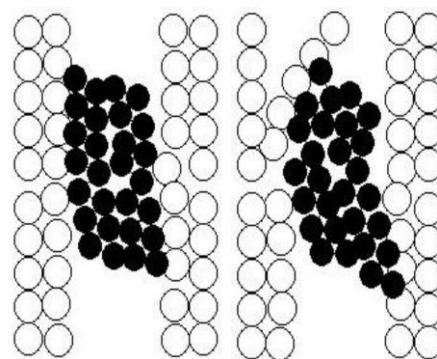


図2. シミュレーションの粗視化モデル (左側:低温領域, 右側:高温領域)

## 4. 研究成果

膜蛋白質の多くは細胞膜と  $\alpha$ -ヘリックスで結合しているものがあり、その結合様式に関して検討した。細胞膜へもぐりこんでいるペプチドを切り出し、膜とのトポロジーを質量分析と化学修飾法を用いて決定した結果、1) このようなペプチドは膜を貫通していること、2) ペプチドは膜内で上下にゆらいでいる速度は分オーダーの速度であり、その活性化エネルギーはリポソーム膜からリン脂質 1 分子が引き抜かれるときの活性化エネルギー(約 70kJ/mol)に近い値であった。

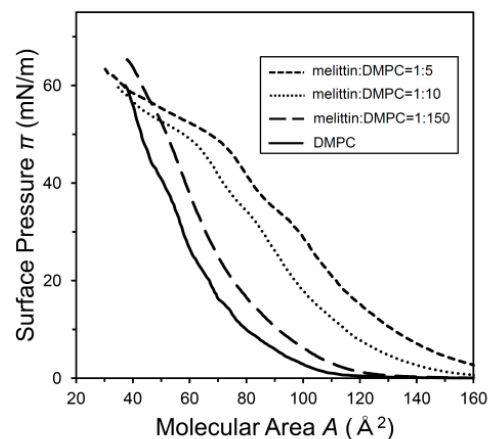


図3. メリチンを作用させたDMPC単分子膜の分子面積-表面圧 ( $\pi-A$ ) 等温線

## 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 7 件)

1. Iizuka, Daisuke; Kawai, Hidehiko; Yoshioka, Susumu; Izumi, Shunsuke; Nishimura, Mayumi; Shimada, Yoshiya; Suzuki, Fumio; “Hepcidin-2 is a urinary biomarker for radiation exposure in mice”, *Analytical Biochemistry*, 430, (2), 査読有, 2012, 179-184

2. Y. Ozaki, H. Matsui, H. Asou, A. Nagamachi, D. Aki, H. Honda, S. Yasunaga, Y. Takihara, T. Yamamoto, S. Izumi : , “Poly-ADP Ribosylation of Miki by tankyrase-1 Promotes Centrosome Maturation”, *Molecular Cell*, 47(5), 査読有, 2012, 694-706 .

3. Y. Fukuyama, R. Tanimura, K. Maeda, M. Watanabe, S. Kawabata, S. Iwamoto, S. Izumi, K. Tanaka : , “Alkylated Dihydroxybenzoic Acid as a MALDI Matrix Additive for Hydrophobic Peptide Analysis”, *Analytical Chemistry*, 84(9), 査読有, 2012, 4237-4243 .

4. S. Nakata, Y. Matsuda, Y. Ikura, A. Takeda, S. Izumi : , “Mode Change in the Self-Motion of a Benzoquinone Disk Coupled with NADPH System” *Chem. Phys. Chem.*, 13(2), 査読有, 2012, 520-524

5. N. Suematsu, A. Awazu, S. Izumi, S. Noda, S. Nakata, H. Nishimori. Localized bioconvection of *Euglena* caused by phototaxis in the lateral direction, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 80, 査読有, 2011, 064003/1-8

6. K. Saikusa, Y. Kono, S. Izumi. Topology and dynamics of melittin within the liposome revealed by a combination of mass spectrometry and chemical modification, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 397, 査読有, 2010, 1-4

7. K. Saikusa, Y. Kono, S. Izumi. , Dynamics Study of Transmembrane Helix within Liposomes by Mass Spectrometry and Chemical Modification, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 58, 査読有, 2010, 75-79

[学会発表] (計 5 件)

1. 東 政行, 七種和美, 栗津暁紀, 泉 俊輔, メリチンのリン脂質膜内での非アレニウス揺らぎ, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 兵庫県立大学 (姫路)

2. Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Shunsuke Izumi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, Highly sensitive MALDI analyses of hydrophobic peptides using a novel additive ADHB with conventional matrices, The 59th Annual Conference on Mass Spectrometry, Sep. 13, 2011, Suita, Japan

3. Kazumi Saikusa, Susumu Yoshioka, Shunsuke Izumi, A Mechanism of the c Ions Formation Involving the “Gly-ization” of the Thr Sidechain in Melittin in MALDI-QIT-TOF, The 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, May. 17, 2011, Denver, USA

4. 東 政行, 七種和美, 栗津暁紀, 泉 俊輔, 膜貫通ペプチドのリン脂質膜内での非アレニウス揺らぎ, 第 3 回日本生物物理学会中国四国支部大会, 2011 年 5 月 14 日, 兵庫県立大学 (姫路)

5. K. Saikusa, S. Izumi, The membrane topology and dynamics of melittin within the liposomes, The 59th ASMS Conference, June 5-9. 2011, Denver, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: 疎水性ペプチド様マトリックス

発明者: 泉 俊輔

権利者: 泉 俊輔

種類: 特許

番号: 12113

出願年月日: 2013 年 3 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 疎水性ペプチド様マトリックス添加剤

発明者: 泉 俊輔

権利者: 泉 俊輔

種類: 特許

番号: 12114

出願年月日: 2013 年 3 月 4 日

国内外の別: 外国

名称: S-ニトロソ物質の質量分析法

発明者: 渡辺 真, 岩本慎一, 佐藤孝明, 田

中耕一, 泉 俊輔

権利者: 株式会社島津製作所, 広島大学

種類: 特許

番号: K1110796

出願年月日: 2012 年 3 月 13 日

国内外の別: 国内

名称: 質量分析用マトリックスの添加剤

発明者：福山裕子，泉 俊輔  
権利者：(株)島津製作所，広島大学  
種類：特許  
番号：K1110228  
出願年月日：2011年9月9日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泉 俊輔 (SHUNSUKE IZUMI)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90203116

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：