

## 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 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658031

研究課題名（和文） 蛍光寿命 FRET で探る膜タンパク質のクラスター解析

研究課題名（英文） Analysis of membrane protein clusters using fluorescence lifetime FRET

## 研究代表者

阿部 文快 (ABE FUMIYOSHI)

青山学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：30360746

## 研究成果の概要（和文）：

酵母トリプトファン輸送体 Tat2 のクラスター解析のため、Tat2-GFP および Tat2-RFP を細胞内で発現させ蛍光寿命 FRET を試みた。しかし発現量が低く有効な光子計数が達成されなかった。方針を変え非変性ゲル電気泳動による分離を行ったところ、Tat2 は大部分がモノマーで存在することがわかった。高圧下で時間分解蛍光偏光解消法を行うシステムを開発し、深海の好圧性細菌における細胞膜物性を解析した。高圧や低温下で生育する微生物の膜は柔軟であると考えられてきたが、予想に反し好圧性細菌の細胞膜は、大腸菌などと比べ著しく剛直であることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

To monitor clustering of the membrane protein using fluorescence lifetime FRET, GFP- or RFP-tagged Tat2, which encodes yeast tryptophan permease Tat2, was expressed in cells. However, the fluorescence signal was too low to obtain operative photon counting. Revising the strategy, native PAGE was performed to elucidate Tat2 clusters. The majority of Tat2 proteins appeared to migrate as monomers after the membrane fraction was moderately treated with a non-ionic detergent. By means of high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement system, fluidity of the plasma membrane was analyzed in a deep-sea piezophile. The membrane revealed to be rigid as opposed to a general concept that the membrane of deep-sea microbes is highly fluid.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学、脂質ラフト

## 1. 研究開始当初の背景

機能場として生体膜を見たとき、膜のドメイン化は分野横断的な注目を集めている。

1997 年、Simons と Ikonen らが提唱した脂質ラフト説である。ラフトではシグナルタンパク質がクラスター化し、スフィンゴ脂質やコ

レステロールと相互作用する。界面活性剤不溶性画分をラフトとする汎用法により、外的シグナルで制御される膜タンパク質が次々と明らかにされてきた。ところが、膜ドメインは本当に存在するのか？膜貫通型タンパク質はどのような機構でラフトに集積するのか？などへの本質的な答えは見いだされていない。Edidin らによる膜タンパク質クラスターの FRET 解析は、数少ない実証例である。私は Edidin 研究室で、ヒト MHC-I が小胞体上で Bap31 タンパク質と相互作用することを解明した。しかし、顕微測光では強度が蛍光分子数に対しシグモイド特性を示す上、ダイナミックレンジが非常に狭い。よって、限られたタンパク質しか FRET 解析の対象にできなかった。また、膜タンパク質の機能や会合状態を知る上で、生体膜の物性を定量的に理解することは重要である。一方、膜の流動性については脂質あるいは脂肪酸組成からの類推で議論されているものの、流動性や剛直性を数値化する試みはほとんどなされていなかった。

## 2. 研究の目的

脂質ラフトは細胞膜のドメインで、膜タンパク質の機能場として脚光を浴びている。機能分子の集積とシグナル伝達、細菌やウイルス感染など疾病との関わりが指摘され始めたからである。しかし解析の多くは界面活性剤不溶性画分をラフトと見なしており、多分子が空間的に集積する姿を捉えた例はほとんどない。分子間相互作用は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定で理解される。だが蛍光強度ベースの FRET はダイナミックレンジが狭く、存在量が大きく異なる分子間の解析にはなすべがない。そこで本課題では、 $10^4$  のダイナミックレンジを実現する単一光子計数法を用いた蛍光寿命計測で FRET を行い、出芽酵母 *Sacchaomyces cerevisiae* における膜タンパク質クラスター、特にトリプトファン輸送体の解析を目的とした。しかしながら後述するように、当初の想定よりも GFP 蛍光が弱く、蛍光寿命測定に十分な蛍光強度が得られなかった。そこで方針に軌道修正を加え、非変性ポリアクリルアミドゲルを用いたトリプトファン輸送体分子の会合状態の解析、トリプトファン輸送体を制御するユビキチン系の関連タンパク質の分子間相互作用解析、およびトリプトファン輸送体のトリプトファン取り込み能に関する解析に主眼を置くことにした。また、私たちは既に *S. cerevisiae* エルゴステロール合成変異株の細胞膜物性を定量的に解析している。本研究ではその測定系を基盤に、深海由来の好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の細胞膜が圧力や低温に応答してどのように変化するのかを明らかにした。

## 3. 研究の方法

出芽酵母のトリプトファン輸送体 Tat2 について GFP と RFP 遺伝子を融合させたプラスミドを構築した。すなわち Tat2-GFP と Tat2-RFP を含むプラスミドを別々に構築し、一細胞内に共発現させる。FRET 測定のポジティブコントロールとして蛍光分子がタンデムに配置した Tat2-GFP-RFP を用いれば最大の FRET 効率が期待される。一方、ネガティブコントロールとしては GFP と RFP が 1 つの膜タンパク質で膜を挟んで両側に配置するようプラスミドをデザインする。この場合、蛍光分子間の距離が 10 nm を越えるため FRET は生じない。Tat2 がクラスターを形成していれば Tat2-GFP と Tat2-RFP が近接するため FRET が生じ、GFP の蛍光寿命が短くなる。一方、モノマーとして分散していれば、GFP の蛍光寿命は GFP 単体のそれと同等のはずである。TAT2, RSP5, EAR1 および SSH4 の発現プラスミドは研究室保有のものを用いた。

生体膜の物性解析については *S. violacea* DSS12 株を用いた。培養菌体を蛍光偏光プローブ TMA-DPH でラベルし、蛍光寿命測定装置 FluoroCube で時間分解蛍光偏光解消法を実施した。このとき、石英窓を取り付けた高圧セルを FluoroCube に設置し、 $10^{\circ}\text{C}$  で 150 MPa までの高圧条件で測定を行い、TMA-DPH の回転ブラウン運動から膜の秩序因子とアシル鎖の回転拡散係数を算出した。

## 4. 研究成果

(1) 出芽酵母における膜タンパク質の解析  
市販の GFP タンパク質を緩衝液に溶解し、470 nm のレーザー光源を用いて蛍光寿命を測定したところ、4-6 ns という値が得られた。10 nm 以内の近傍に RFP などのエネルギー受容体が存在すれば、この値はより短くなることが予想された。Tat2-GFP 発現プラスミドを酵母に導入し蛍光寿命測定を試みた。しかしながら多コピーベクターを用いても、測定に有効な蛍光強度は得られなかった。すなわち、プラスミドを有しない菌株からの自家蛍光が実験区の 50%程度に達しており、内在性分子の蛍光が無視できない強度であることがわかった。これについては今後、細胞膜のみをシヨ糖密度勾配遠心法で分離し測定を行う予定である。

非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行ったところ、プロトン  $\text{H}^+$ -ATPase である Pma1 は多量体を形成し高分子量側にバンドが確認されたのに対し、Tat2 はそのほとんどが単量体として存在することがわかった。ただし、会合分子が電気移動中に分離した可能性もあるため、やはり単離した膜上での蛍光寿命 FRET による解析が求められる。

出芽酵母の Ear1 と Ssh4 はいずれも

multivesicular body に局在するタンパク質で、PPxY (Pro-Pro-x-Tyr) モチーフを有する。Ear1 と Ssh4 を過剰発現させたところ、トリプトファン要求性の YPH499 株が 25 MPa の高圧条件下で増殖可能となった。トリプトファン要求株における高圧増殖の支配要因は、細胞膜に局在するトリプトファン輸送体 Tat2 の機能である。高圧下で Tat2 は Rsp5 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、分解される。Ear1 と Ssh4 の過剰発現株では、Tat2 の分解が抑えられ安定化していることがわかった。Ear1 と Ssh4 は Rsp5 の WW ドメインと相互作用することが知られている。従って、Ear1 と Ssh4 は PPxY モチーフを介して Rsp5 の WW ドメインと相互作用し、Tat2 のユビキチン化を負に制御する因子であることが期待される。そこで現在、Ear1-RFP、Ssh4-RFP、および Rsp5-GFP の発現ベクターを構築中である。すなわち、Rsp5 と両タンパク質が細胞内で真に相互作用しクラスターを形成するならば、結果として GFP の蛍光寿命が短くなるはずである。

## (2) 好圧性細菌における細胞膜の解析

蛍光偏光試薬 DPH やその誘導体 TMA-DPH は、人工膜の物性を調べるためこれまで広く用いられてきた。DPH が脂質二重層のアシル鎖尾部（膜中央部）に位置するのにに対し、TMA-DPH は末端に正電荷を持つため脂質二重層の極性頭部にアンカーされる。蛍光異方性 (fluorescence anisotropy,  $r$ ) は式 (1) で定義され、膜が剛直であれば  $r$  値は高く、乱雑さが増すとその値は低下する。

$$r = (I_{VV} - G I_{VH}) / (I_{VV} + 2G I_{VH}) \quad (1)$$

ここで、 $I$  は蛍光強度、 $H$  と  $V$  は励起偏光に対しそれぞれ水平および垂直方向の蛍光成分を意味する。 $G$  は装置関数である。私たちは蛍光寿命の時間分解測定を利用し偏光解消法を行っており（以下、時間分解蛍光偏光解消法）、酵母菌の細胞膜エルゴステロールとその誘導体が膜におよぼす影響を調べてきた。 $r$  の時間変化は式 (2) で表される。

$$r(t) = [I_{VV}(t) - G I_{VH}(t)] / [I_{VV}(t) + 2G I_{VH}(t)] \quad (2)$$

脂質二重層に埋め込まれた分子は回転が制限されているので、異方性の時間変化は最も単純な近似で式 (3) で表される。

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp(-t/\theta) + r_\infty \quad (3)$$

ここで、 $r_0$  は蛍光分子が動いていないときの異方性、 $r_\infty$  は完全に偏光解消したときの異方性、 $\theta$  は蛍光分子の回転相関時間である。ここで重要となるのが秩序因子 ( $S$ , order parameter) と蛍光分子の回転相関係数 ( $D_w$ , rotational diffusion coefficient) であり、それぞれ式 (4) と (5) で表される。

$$S = (r_\infty / r_0)^{1/2} \quad (4)$$

$$D_w = (r_0 - r_\infty) / 6\theta r_0 \quad (5)$$

膜の秩序が低下すると  $S$  は低下し、アシル鎖

の回転運動が激しくなると  $D_w$  は高くなる。最近私たちは 200 MPa までの高圧下で時間分解蛍光偏光解消法を行うシステムを開発し、これを High-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement system (HP-TRFAM) と呼んでいる。Fig. 1. にそのシステム構成を示す。

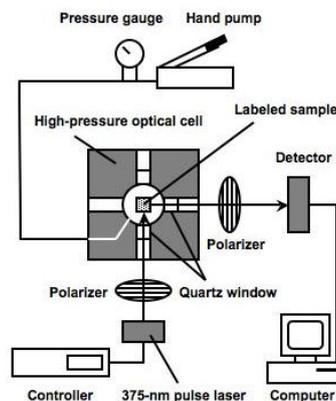


Fig. 1. Construction of a system employing HP-TRFAM

*S. violacea* DSS12 の細胞膜の物性を HP-TRFAM を用いて解析した。培養菌体を緩衝液で洗浄後 TMA-DPH でラベルし、10 °C で 0.1~150 MPa の圧力下で HP-TRFAM を行った。EPA の役割を知るため、合成系遺伝子の一つ *pfaA* を破壊した  $\Delta pfaA$  株についても同様の測定を行った。野生株は 50 MPa で良好に増殖するが、 $\Delta pfaA$  株では増殖速度が低下する。興味深いことに、野生株の細胞膜は大気圧下でも非常に剛直で、 $S$  は 0.9 という高い値を示した (Fig. 2A)。大腸菌などと比べてもはるかに膜の流動性は低い。しかも 150 MPa まで加圧してもこの値は大きく変化せず、野生株の細胞膜は常に剛直であることがわかった。ところが予想に反し、 $\Delta pfaA$  株では EPA を欠損しているにもかかわらず、膜の  $S$  は野生株よりもむしろ低い値を示し、剛直性が失われていた。また、加圧とともに  $\Delta pfaA$  膜の  $S$  は増大することがわかった (Fig. 2A)。一方、 $D_w$  は野生株よりも  $\Delta pfaA$  株において高く、膜の剛直性が失われるとともに、 $\Delta pfaA$  株では脂質アシル鎖の回転運動が高まっていた (Fig. 2B)。いずれの細胞膜でも加圧とともに  $D_w$  は低下し、アシル鎖の回転運動は抑制されたが、その傾向は  $\Delta pfaA$  株でより顕著だった (Fig. 2B)。

では、なぜ EPA を含む野生株の細胞膜は、EPA を含まない  $\Delta pfaA$  株より剛直なのだろうか？両者の脂肪酸組成を比較したところ、興味深い結果が得られた。野生株の全脂肪酸に占める EPA の割合は約 11% なのだが、 $\Delta pfaA$

株では EPA が消失するとともにパルミトレイン酸 (palmitoleic acid, C16:1) の割合が 24% から 49% に増大していた。すなわち、*S. violacea* DSS12 では EPA の欠損に伴い細胞膜脂質が大規模に再構築されていたのである。<sup>2</sup>H-NMR や分子シミュレーションの結果によると、同じく多価不飽和脂肪酸である DHA (C22:6) は膜内でコイル状となり平均長が 0.82 nm なのに対し、オレイン酸 (oleic acid, C18:1) では 1.42 nm とむしろ長いことがわかっている。EPA も脂質二重層中で DHA のようにコンパクトで細胞膜表層付近の剛直性を高めているのかもしれない。一方、倍増したパルミトレイン酸は  $\Delta pfaA$  株の膜をかさ高くし、剛直性の低下を引き起こしたものと解釈される。

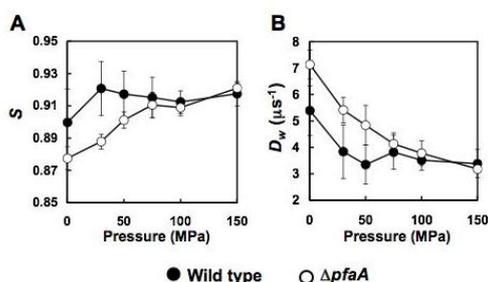


Fig. 2. Effects of high pressure on the dynamic structure of the membrane in *S. violacea* wild-type strain and the  $\Delta pfaA$  mutant. Cells were labeled with 0.5  $\cdot$  M TMA-DPH in TE buffer containing 0.5 M NaCl. (A) Changes in the order parameter  $S$  as a function of pressure. (B) Changes in the rotational diffusion coefficient  $D_r$  as a function of pressure

## 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) 全て査読有り

① Usui, K., Hiraki, T., Kawamoto, J., Kurihara, T., Nogi, Y., Kato, C., and Abe, F. (2012) Eicosapentaenoic acid plays a role in stabilizing dynamic membrane structure in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea*: a study employing high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 574-583.  
DOI:10.1016/j.bbame. 2011. 10. 010

② Hiraki, T., Sekiguchi, T., Kato, C.,

Hatada, Y., Maruyama, T., Abe, F. and Konishi, M. (2012) New type of pressurized cultivation method providing oxygen for piezotolerant yeast. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 220-223.

DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.09.017

③ Klippel, B., Lochner, A., Bruce, D. C., Davenport, K. W., Detter, C., Goodwin, L. A., Han, J., Han, S., Land, M. L., Mikhailova, N., Nolan, M., Pennacchio, L., Pitluck, S., Tapia, R., Woyke, T., Wiebusch, S., Basner, A., Abe, F., Horikoshi, K., Keller, M., Antranikian, G. (2011) Complete genome sequence of the marine, cellulose and xylan degrading bacterium *Glaciecola* sp. 4H-3-7+YE-5. *J. Bacteriol.* 193, 4547-4548.  
DOI: 10.1128/JB.05468-11

④ Klippel, B., Lochner, A., Bruce, D. C., Davenport, K. W., Detter, C., Goodwin, L. A., Han, J., Han, S., Land, M. L., Nolan, M., Ovchinnikova, G., Pennacchio, L., Pitluck, S., Tapia, R., Woyke, T., Wiebusch, S., Basner, A., Abe, F., Horikoshi, K., Keller, M., Antranikian, G. (2011) Complete Genome Sequences of *Krokinobacter* sp. 4H-3-7-5 and *Lacinutrix* sp. 5H-3-7-4, polysaccharide-degrading members of the family *Flavobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 193, 4545-4546.

DOI: 10.1128/JB.05518-11

⑤ Nishiguchi, Y., Abe, F. and Okada, M. (2011) Different pressure resistance of lactate dehydrogenases from hagfish is dependent on habitat depth and caused by tetrameric structure dissociation. *Marine Biotechnol.* 13, 137-141.

DOI :10.1007/s10126-010-9299-6

⑥ Hiraki, T., Usui, K. and Abe, F. (2010) Overexpression of *EAR1* and *SSH4* that encode PPxY proteins in the multivesicular body provides stability of tryptophan permease Tat2 allowing yeast cells to grow under high hydrostatic pressure. *High Pressure Research* 30, 514-518.

DOI:10.1080/08957959.2010.525512

⑦ Hiraki, T. and Abe, F. (2010) Overexpression of *SNA3* stabilizes tryptophan permease Tat2, potentially competing for the WW domain of Rsp5 ubiquitin ligase with its binding protein. *Bull. FEBS Lett.* 584, 55-60.

DOI: 10.1016/j.febslet.2009.11.076

〔学会発表〕(計5件)

①阿部文快 (2012)、高圧力下における微生物細胞膜の構造と機能、日本高圧力学会、同志社大学、京都

②完田奈緒子、阿部文快 (2012)、ランダム変異導入法による出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の機能解析、日本農芸化学会大会、京都女子大学、京都

③完田奈緒子、阿部文快 (2011)、ランダム変異導入による高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の機能解析、酵母遺伝学フォーラム、九州大学、福岡

④阿部文快(2010)、オルガネラ膜の動的構造解析、酵母遺伝学フォーラム、ならまちセンター、奈良

⑤Abe, F. (2010) Dynamics of microbial membranes under high pressure: a study using time-resolved fluorescence anisotropy measurement. 6th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2010), Technische Universitat, Freising, Germany

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.aoyama.ac.jp/Chem/ChemHP/abeflab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 文快 (ABE FUMIYOSHI)

青山学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：30360746