

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590043

研究課題名(和文)細胞膜におけるタンパク質集合の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of protein assembly in cell membranes

研究代表者

三浦 隆史(MIURA, Takashi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30222318

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、細胞膜におけるタンパク質集合の制御機構を解明することを目的として、脂質膜の構造と流動性に与えるタンパク質の影響を調べた。diphenylhexatriene(DPH)の蛍光異方性を利用した研究により、アミロイドペプチドは脂質膜の流動性を低下させることが示されていた。しかし、DPHは脂質膜からペプチド、タンパク質に移行するため、DPH蛍光異方性は脂質膜の流動性に対するタンパク質の影響を調べる目的には不適切であることがわかった。そこで、本研究では、脂質膜の構造や物理的性質を調べるための新規手法を開発した。

研究成果の概要(英文):Effects of proteins on the structure and fluidity of lipid membranes were investigated to reveal the regulatory mechanism of protein assembly on cell membranes. Several studies have reported that Aβ peptide decreases fluidity of membranes based on an Aβ-induced increase in the fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene (DPH). However, this study showed that the extraction of DPH by peptides or proteins can disturb the estimation of membrane fluidity by using the fluorescence anisotropy of DPH. Therefore we developed novel methods to investigate the structures and physical properties of lipid membranes by using Raman and CD spectroscopies.

研究分野：構造生物学

キーワード：脂質膜 タンパク質 ラマン分光法 蛍光分光法 円偏光二色性

1. 研究開始当初の背景

近年、スフィンゴ脂質とコレステロールが局在する脂質ラフトと呼ばれる領域(膜ドメイン)が細胞膜内にあることがわかってきた。脂質ラフトは細胞の機能発現に際して、必要な膜タンパク質を集めるための動的かつ機能的な分子群であると考えられ、必要なときだけ形成されるらしい。例えば、T細胞シグナル伝達の際には、刺激に応じてマイクロメートルスケールのドメインが細胞膜に現れ、このドメインにシグナル伝達に関わるタンパク質が集積される。一方、アルツハイマー病の原因となるアミロイドペプチド(A β)の凝集はペプチドが脂質ラフトに集積することで促進されることが知られており、インフルエンザウイルスは宿主細胞により合成された自己のタンパク質の集合場所として脂質ラフトを利用して、即ち、タンパク質を集積させる脂質ラフトの性質は、細胞の機能発現のために必須であるばかりでなく、病気の発症とも密接に関係している。

既に存在する脂質ラフトに対して親和性を示す分子の構造や特長については知見が蓄積されつつあるが、脂質ラフトの形成と消滅の制御機構は依然として不明である。本研究を立案するにあたり、研究代表者は自身が行ってきた研究成果を基に、タンパク質-脂質相互作用により誘起される脂質膜の物理的性質(パッキング、流動性など)の変化が、タンパク質集積場としての脂質ラフト形成・崩壊のトリガーとなる可能性があると考えた。本研究の背景を、以下に整理して記す。

(1)脂質ラフトにおける脂質膜は秩序液体相と呼ばれる、脂質分子が密にパッキングされた状態にある。高コレステロール含量のため、ラフト内の流動性はゲル相と比べれば高い状態で保たれるものの、ラフト外の液晶相に近い膜領域と比べれば低下していると予想される。研究代表者は、脂質膜に対するA β の親和性が、液晶相からゲル相への膜相転移により顕著に増大することを見出し、ペプチドが膜の秩序性の違いを識別する能力を有することを初めて示した[Yoda et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 56-59 (2008)]。即ち、細胞の脂質二重膜は流動性を持つことにより膜タンパク質の側方への動きを許容するのみならず、膜内で流動性やパッキングの高低のコントラストをつけることにより、タンパク質を局所に集めることができる可能性がある。

(2)一般に、ペプチドやタンパク質は脂質膜に結合して、その周囲の膜の流動性に影響を及ぼすことが知られている。研究代表者は、過去の研究において脂質膜の流動性に対するA β などのペプチドの結合の影響を調べており、特定の脂質組成や相状態の

膜に対して強い流動性抑制効果が現れることを見出した。

(3)以上の知見および考察から、ある種のタンパク質は脂質膜に結合することによって結合部位周囲の膜の流動性やパッキングに影響を及ぼし、他のタンパク質に対する親和性が高い部位を膜内に生じさせることにより、タンパク質集積場形成のトリガーとなることが予想された。

一方、脂質膜の流動性は、脂質膜結合性プローブの蛍光異方性やモノマー・エキサイマー発光比を用いて、プローブ分子の動き易さを指標とすることで間接的に評価されている。脂質膜の流動性制御メカニズムが未だに解明されていないこと背景には、これらの汎用的手法はタンパク質と脂質の相互作用に関する情報を与えないことがあられると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、脂質膜の構造と流動性に与えるタンパク質の影響をラマン分光法などの構造解析手法を用いて調べることにより、細胞膜におけるタンパク質集合のOn-Offスイッチ機構を解明することを目的とする。

具体的には、流動性を評価する汎用手法である蛍光法に、ラマン分光法から得られるタンパク質アミノ酸側鎖のマイクロ環境と脂質分子の構造に関する情報、さらに円偏光二色性から得られるタンパク質二次構造の情報を組み合わせることにより、次の2点を明らかにする。

タンパク質による脂質膜流動性促進および抑制の分子メカニズムを明らかにする。

タンパク質により誘起される脂質膜流動性の減少が他のタンパク質の集合のトリガーとなる可能性を検証し、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

アミロイドペプチド(A $_{1-42}$)は和光純薬製の市販品を購入した。プリオンタンパク質の中央部疎水領域に相当するペプチドは現有のペプチド合成器を使用して合成し、HPLCにて精製した。ホスファチジルコリン等の脂質はAvanti Polar Lipids社製の市販品を購入した。リポソームは超音波法により調製した。ラマンスペクトルとCDスペクトルはそれぞれJASCO NRS-3100とJASCO J-820を用いて測定した。

4. 研究成果

(1)脂質分子のパッキング状態がタンパク質の脂質膜に対する親和性に与える影響
細胞膜には、周囲の膜とは組成や物理的性質の異なるマイクロドメインが点在し、ブ

リオン病やアルツハイマー病など神経変性疾患の発症と密接に関わっていると考えられているが、本研究により、プリオンタンパク質の中央部疎水領域とアミロイドペプチド(A β)は、両者に共通する特徴として、構成脂質が密にパッキングするラメラゲル相膜に対して高い親和性を持つことが明らかになった。さらに、膜の相の違いは、親和性のみならず、ペプチドの二次構造にも影響する可能性も示された。これまでに得られた結果から、ペプチドの病原型構造への転移メカニズムを解明するには、糖鎖や電荷など膜表面の化学組成・性質のみならず、脂質分子のパッキング状態がペプチドと膜の相互作用に与える影響も考慮に入れる必要があることが示された。

(2) 脂質膜の流動性、秩序性等の物理的性質を計測するための新規手法の開発

現在、脂質膜の流動性を見積もる方法として、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)の蛍光異方性が汎用されている。過去に行われた多くの研究により、細胞膜やリポソームにA β を添加すると、膜中のDPHの蛍光異方性が増大することが報告されている。これを根拠として、A β は脂質膜の流動性を低下させる作用を持つと考えられている。

本研究において、DPHを含む脂質膜にA β を添加することによるDPH蛍光異方性の変化を調べたところ、顕著な増大が観測され、過去の結果を再現した。しかし、脂質分子の分子間相互作用に鋭敏であることが知られる脂質膜のラマンスペクトルはA β を添加しても全く変化せず、A β が脂質膜の流動性を低下させるという従来の説明と矛盾を生じた。

一方、DPHを含む脂質膜にA β を添加するとアキラな分子であるDPHのCDが観測された。脂質分子はキラルであるため膜内に含まれるDPHのCDを誘起する可能性があるが、脂質のD体、L体に依らずDPHの誘起CDは正の符号を持っていた。この結果から、観測されたDPHのCDは脂質ではなく、A β により誘起されたことがわかった。即ち、DPHを含む脂質膜にA β を添加すると、DPHが脂質膜から脱離して、会合状態にあるA β ペプチドと結合すると考えられる。DPHの動きはA β のオリゴマーや線維に結合することにより強く制限されると考えられるため、DPH蛍光異方性は、脂質膜の流動性を正しく反映しない可能性がある。本研究により、DPH蛍光異方性は、A β 共存下では膜流動性の計測手段として不適切であることが示された。

本研究の目的である、タンパク質による脂質膜流動性促進および抑制の分子メカニズムを解明するためには、従来、最も汎用されていたDPH蛍光異方性は利用できないことがわかったため、新たな手法を開発す

る必要が生じた。本研究で開発に成功した、流動性、その他の膜の物理的性質を計測するための新規手法は以下の通りである。

脂質膜に結合させたアゾベンゼン誘導体の共鳴ラマン散乱を利用して脂質膜の秩序性を計測する新規手法を開発した。見出された共鳴ラマンプローブと顕微ラマン分光装置を組み合わせると、単一細胞中の径1 μ m程度の限られた領域の膜秩序性を計測することも可能である。

コレステロールが脂質膜中において会合する性質は膜タンパク質の集合・離散の制御に重要な意味を持つと考えられている。蛍光性のコレステロール誘導体であるdehydroergosterol (DHE)を用いて膜中における存在状態の解析が試みられた例はあるが、会合したDHEは自己消光により蛍光を発さなくなるという問題があった。本研究では、DHEの円偏光二色性を用いて会合状態の解析が可能であることを明らかにした。

本研究の成果を踏まえると、A β やその他のタンパク質が脂質膜の流動性に与える影響を調べた過去の研究の多くは再検証される必要があると思われる。本研究で開発された新規手法は、脂質膜の構造・物性研究に広く用いられると期待される。

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 2 件)

“Effect of amyloid β -peptide on the fluidity of phosphatidylcholine membranes: Uses and limitations of diphenylhexatriene fluorescence anisotropy” (査読あり)
Masako Suzuki and Takashi Miura
Biochim. Biophys. Acta, 1848, 753-759 (2015).
doi:10.1016/j.bbamem.2014.12.003

“His-Trp Cation- π Interaction and Its Structural Role in an α -Helical Dimer of HIV-1 Vpr Protein” (査読あり)
Takayuki Kamiyama, Takashi Miura, and Hideo Takeuchi
Biophys. Chem., 173-174, 8-14 (2013).
doi:10.1016/j.bpc.2013.01.004

{ 学会発表 } (計 10 件)

Limitation of the use of diphenylhexatriene to measure the fluidity of membrane in the presence of amyloid β -peptide

Masako Suzuki, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi

第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日-27 日、札幌

Assignments of His residues in the Cu²⁺-binding sites of the denatured apo-SOD1

Nobuhiro Fujimaki, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi

第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日-27 日、札幌

Acquisition of pro-oxidant activity by fALS-linked SOD1 mutants A4V and G93A
Ken Nishiya, Nobuhiro Fujimaki, Furi Kitamura, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi, Hideo Takeuchi

第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日-27 日、札幌

家族性 ALS に関連した変異 SOD1 のミスフォールディングと酸化促進性獲得
西屋健、北村富里、三浦隆史、竹内英夫
第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、東北大学

銅輸送タンパク質 Ctr4 の一価銅安定化作用における芳香族性側鎖の役割

岡田穂子、三浦隆史
第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、東北大学

蛍光異方性を利用した脂質膜流動性測定に与える A ペプチドの影響

鈴木麻紗子、三浦隆史
第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、東北大学

Relationship between physical properties of lipid membranes and amyloidogenesis

Takashi Miura, Masako Suzuki
第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日-30 日、京都

Role of Tryptophan Residues in Cu(I) Binding of Fission Yeast Copper Transport Proteins

Mariko Okada and Takashi Miura
7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 2013 年 8 月 25-30 日、神戸

神経変性疾患原因ペプチドの脂質膜結合に対する膜相状態の影響

三浦隆史、依田真由美、東海林秀樹、志賀聡司、竹内英夫
第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012 年 11 月 15-16 日、京都大学薬学部

プリオンタンパク質神経毒性セグメントと酸性脂質膜の結合に対する膜相状態の影響

志賀聡司、三浦隆史、竹内英夫
第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 10 月 7 日、青森大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
三浦 隆史 (MIURA, Takashi)
東北大学大学院・薬学研究科・准教授
研究者番号：30222318

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：