

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410187

研究課題名(和文) 肢再生制御蛋白質におけるGPIアンカー機能の膜存在下での固体NMRによる解明

研究課題名(英文) The Role of Anchor in the Prod1 essential in Newt Limb Regeneration

研究代表者

三浦 薫(野村薫)(Miura, Kaoru)

公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・研究員

研究者番号：90353515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イモリの肢の再生の初期過程におけるProd1のアンカリングの役割解明を、単純化したGPIアンカー模倣分子を結合させた擬似的なアンカー型Prod1を用いて試みた。固体NMR、蛍光顕微鏡、動的光散乱を用いて、Prod1同士が膜上で会合していること、会合状態でもProd1の立体構造は変化しないこと、さらにProd1は膜界面だけではなく他の膜上のProd1とも会合し、Prod1を介した膜同士の接合も起こすことを明らかにした。このように、サンショウウオ科特有の蛋白質であるProd1の膜へのアンカリングは、失った肢を再生する過程において細胞接着を増強させる効果があることを提案した。

研究成果の概要(英文)：Newt Prod1 is tethered to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol(GPI) anchor. We clarified the role for the anchoring of Prod1 using synthetic mimic of GPI-anchored Prod1 by solid-state NMR, fluorescence microscopy, and DLS measurement. Anchoring to the membrane drastically reduced the motion of Prod1 which attributed to the aggregation formation of anchored Prod1 on membranes. Three dimensional structure of the anchored Prod1 was not affected by aggregates formation on the membranes. The aggregated anchored Prod1 easily interacted with the anchored Prod1 tethered on opposing membrane surfaces, inducing membrane adhesion. Anchoring to the membrane is one of the reasons of the aggregation and following cell adhesion, but the high affinity between Prod1 should be also required for these phenomena. Thus, our results strongly assert the role of anchor in the salamander-specific protein Prod1 in assisting the cell adhesion function in the limb regeneration process.

研究分野：生物物理化学

キーワード：GPIアンカー型タンパク質 固体NMR 肢再生 脂質二重膜

1. 研究開始当初の背景

イモリなどの有尾両生類は我々哺乳動物とは違い、肢の再生能力が極めて高い。イモリの Prod1 はこの失った肢を再生する際に働く GPI アンカー型タンパク質である。GPI アンカーを欠損させたタンパク質部分のみの立体構造は、これまでに NMR により決定されており、1つのヘリックスと5つのストランドを持つ three finger protein (TFP) ドメインからなることが分かっている(図1)。

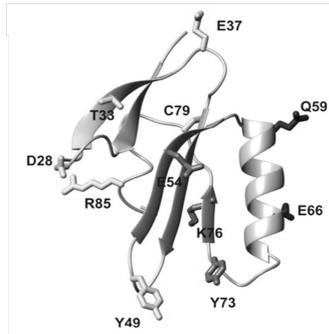


図1. イモリの Prod1 の膜外部分の立体構造 (Garza-Garcia et al. *PLoS One*, vol. 4, e7123, (2009)より抜粋)

Prod1 は、切断面に近い部分では濃度が濃いが、指先に向かうにつれて濃度が薄くなっており、イモリの肢の再生の遠近軸情報は Prod1 自身の濃度勾配により規定されていると考えられている。遠位の再生芽を近位のものとともに培養すると、近位の再生芽は遠位のを抱き込むが、酵素により GPI アンカー部分を切断するとこの現象はみられなくなる。また、Prod1 を欠損させたイモリでは、肢が正常に成長せず、短い肢が奇形の状態では形成される。これらの結果は GPI アンカーによる修飾が Prod1 の肢の再生や発生の際に必要なことを示唆している。GPI アンカーは、ホスファチジルイノシトールにマンノース、グルコサミンなどの糖やエタノールアミンが結合した糖脂質であり、一般的にはタンパク質を膜近傍に繋ぎ止めたり、タンパク質を細胞表面のマイクロドメイン(ラフト)等の特定部位に選択的に輸送し、集積させる役割を果たしているが、何故イモリの Prod1 が GPI アンカーで修飾されているかは未だわかっていない。

2. 研究の目的

イモリの肢の再生の初期過程における Prod1 の膜へのアンカリングの役割として、我々は次の2つの可能性を考えた。

A) Prod1 が生体膜と相互作用することが重要であり、アンカーによって Prod1 が膜近傍に繋ぎ止められていることで、相互作用が可能になる。

B) アンカーによって Prod1 がラフト領域に集積し、膜表面近傍にいることが重要で、Prod1 自身と膜の相互作用はない。

脂質膜に挿入した GPI アンカー型タンパク質は、分子の運動性が低いことや、結晶化が難しいことから相互作用や構造を解析するには固体 NMR 法での解析が適している。そこで我々は、固体 NMR 法を主に用いて、上記の可能性を検証することとした。しかしながら、天然型の GPI アンカー型タンパク質は非常に複雑な構造をしているため、サンプル量を確保することが困難である。そのため、GPI アンカーを模倣した分子を合成して Prod1 と結合させて膜に挿入し、以下にあげた4つの点を中心に Prod1 と脂質膜との相互作用を解析することを計画した。

- 1) アンカー型 Prod1 の膜上での運動性
- 2) 脂質膜上での Prod1 の局在化
- 3) Prod1 を介した膜接着
- 4) 膜上にアンカリングした Prod1 の立体構造

これらを明らかにすることにより、有尾両生類の肢の再生の初期段階において、Prod1 の構造に特有の GPI アンカーがどのように寄与しているかを分子レベルで理解することを目的とした。

3. 研究の方法

膜結合型 Prod1 の調製

Prod1 は GPI アンカー型の膜タンパク質であるが、GPI アンカーが付加した状態で発現させる場合には動物細胞の細胞膜に発現させることになる。動物細胞内で小胞体からゴルジ体、そして細胞膜へと移行し自然に生合成されるが、まだこのようなタンパク質の大量発現系は構築されておらず、GPI が付加した形で Prod1 を必要量発現精製することは難しい。これまで、GPI アンカー部分を模倣した分子を合成し、GPI アンカーの代わりとして後からタンパク質に連結させるという研究が報告され、GPI アンカーがプリオンタンパク質の働きに与える影響の解明等に応用されつつある。我々はこれらの方法に習い、独自の GPI アンカー模倣分子を作成し、モデルタンパク質に結合させて、膜への再構成を行うこ

とにこれまで成功している(図2)。この手法を Prod1 へ応用し、擬似的な GPI アンカー型 Prod1 を作成し、膜に再構成させた。

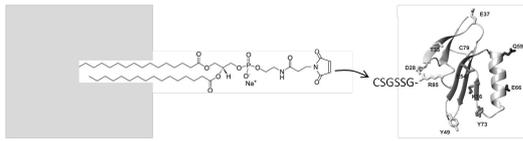


図2．脂質二重膜に再構成された擬似的な GPI アンカー型 Prod1 の模式図

手順は以下の通りである。

(1) Prod1 の膜外部分の発現と精製

まずは、Prod1 の C 末端がアンカーと共有結合するように発現ベクターを構築し、Prod1 の膜外タンパク部分を大腸菌の大量発現系で発現後、精製した。これまでに報告されている Prod1 の膜外部分の発現、精製方法を参考にし、 ^{13}C や ^{15}N で安定同位体標識した Prod1 を必要量準備した。

(2) GPI アンカー模倣分子の化学合成

GPI アンカー部分の合成は複雑すぎて、全合成をするためには多大な時間と労力を必要とする。そこで、これまでに上記の様に簡略化した新規の GPI アンカー模倣分子を化学合成した。さらにタンパク質の連結部分との反応性を高めるために、アンカーのデザインを改良した。

(3) GPI アンカー模倣分子と Prod1 の膜外部分との連結と反応物の精製

酵素である Sortase A を用いて、大腸菌の系で発現、精製した Prod1 の膜外部分にこの GPI アンカー模倣分子を酵素化学的に連結させて擬似的な GPI アンカー型 Prod1 を調製した。さらに、SortaseA や結合せずに残っているフリーのアンカーと Prod1 を除くために精製を行った。

(4) Prod1 の脂質二重膜への再構成

リポソームに精製済みのアンカー型 Prod1 を再構成させた。我々は、これまでに界面活性剤を用いて脂質二重膜を可溶化した後、界面活性剤をプラスチックビーズで吸着させて取り除く方法により擬似的な GPI アンカー型モデルタンパク質の脂質二重膜への再構成に成功しており、これと同様の方法で再構成を行った。この他、バイセルや支持平面膜等、測定方法に合わせて各種脂質二重膜に対してアンカー型 Prod1 を挿入した膜サンプルを調整した。

Prod1 と脂質との相互作用解析

上記の手順で調整した膜挿入型 GPI アンカー型 Prod1 に対し、固体 NMR、蛍光顕微鏡、動的光散乱を用いて Prod1 と脂質膜との相互作用を解析した。

(1) 固体 NMR によるアンカー型 Prod1 の膜上での運動性解析

各種 ^{13}C 、 ^{15}N 固体 NMR スペクトルを測定し、その強度の違いにより、膜上における Prod1 の運動の速さを見積もる。

(2) 支持平面膜上での蛍光顕微鏡による局在化の解析

蛍光標識したアンカー型 Prod1 を支持平面膜に挿入して、Prod1 の局在を蛍光顕微鏡で観測した。なお、ラフト親和性を観測するために、脂質ラフトの環境を模倣したパターン化平面膜を用いた。

(3) 動的光散乱による膜接着の解析

アンカー型 Prod1 が膜を接着して膜の集合体を形成しているかを解析するために、動的光散乱を用いてアンカー型 Prod1 の存在下と非存在下におけるリポソームの粒子径を測定した。

(4) NMR による膜上にアンカリングした Prod1 の立体構造解析

連鎖帰属法を用いて Prod1 の溶液中におけるシグナルの帰属を行った。リポソームに再構成した GPI アンカー型 Prod1 の ^{13}C - ^{13}C 相関固体 NMR スペクトルを測定し、帰属した化学シフト値から想定されるスペクトルパターンと比較して構造を解析した。

4. 研究成果

膜に再構成したアンカー型 Prod1 の固体 NMR スペクトルを測定したところ、C 末端のリンカー部分のみが高い運動性を示しており、タンパク質部分は動きが抑えられていた。このことより、タンパク質-タンパク質もしくはタンパク質-膜の強い相互作用が考えられたが、蛍光標識したアンカー型 Prod1 を平面膜に挿入して、Prod1 の局在を蛍光顕微鏡で観測することで、Prod1 同士が会合していることを確認した。このような会合は Prod1 の溶液やアンカー型 GB1 では見られなかった。また、会合体は膜上では動いていないのに比べ、一分子を示す輝点は膜上で運動していることより、Prod1 は膜表面においてタンパク質同士で会合するのみで、Prod1 と膜との直接の相互作用はないことがわかった。また、一分子追跡によりアンカー型 Prod1 の脂質ラ

フト親和性を解析した結果、アンカー型 Prod1 はラフト領域への高い親和性を示した。次に、会合時におけるタンパク構造の変化を膜に再構成した GPI アンカー型 Prod1 の ^{13}C - ^{13}C 相関固体 NMR スペクトルの交差ピークの化学シフト値により解析した。その結果、Prod1 は構造を保持したまま会合していることが分かった。同じ GPI アンカー型タンパク質に属するプリオンは会合する際に ヘリックスから シートに変化することが知られているが、Prod1 の会合は違うメカニズムであることを示している。さらに Prod1 は膜界面だけではなく、他の膜上の Prod1 とも会合し、Prod1 を介した膜同士の接合も起こることが動的散乱実験より明らかになった。以上のように、イモリの Prod1 におけるアンカリングは Prod1 を脂質膜の界面に限定的に局在させ、さらにラフト領域に集積させることで膜上での Prod1 - Prod1 間の会合を促す。それがトリガーになり、さらに別の膜上の Prod1 との会合も誘起することで、Prod1 に接着タンパクとしての機能を付与する役割を果たしているのではないかと考えられる。

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 2 件)

- 1) Nomura, Harada, Sugase, and Shimamoto, "Solid-state NMR spectra of lipid-anchored proteins under magic angle spinning." *J Phys Chem B*, (査読有) vol. 118, (2014) pp.2405-2413. DOI: 10.1021/jp4124106
- 2) Nomura, Villegas and Corzo, "Solid-State NMR Studies of Antimicrobial Peptides from Arachnid Venoms." *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, (査読有) vol. 3, (2014) pp.107-120. DOI: 10.3233/BSI-140082

[学会発表](計 7 件)

- 1) Nomura, "Solid state NMR study of crystalline state DMPC and lipid-anchored protein in membranes." PACIFICHEM 2015, Advances in Biological Solid State NMR (#120), 2015.12.15-20 (ハワイ) (招待講演)
- 2) Nomura, Harada, Sugase, Shimamoto, Hayashi, and Morigaki, "Solid-state NMR and Microscopic Studies of Synthetic Mimic of GPI-anchored Proteins." PACIFICHEM 2015, Self-organization of membrane systems (#259), 2015.12.15-20 (ハワイ)
- 3) 野村 薫, "脂質二重膜とそれに繋がるタンパク質の固体NMR"、固体NMR材料フォー

ラム、2015.10.22-23 (高知大学) (招待講演)

- 4) 野村、原田、菅瀬、島本、"GPI アンカー型蛋白質模倣分子の脂質二重膜存在下での固体 NMR 測定" 第 52 回 NMR 討論会、2013.11.12-24 (石川県立音楽堂)
- 5) Nomura, "Solid-state NMR spectra of pseudo-GPI-anchored proteins in membranes under magic angle spinning." 5th Asia-Pacific NMR Symposium, 2013.10.27-31 (オーストラリア) (招待講演)
- 6) 野村、原田、菅瀬、島本、"GPI アンカー型蛋白質模倣分子の脂質二重膜存在下での固体 NMR 測定" 日本膜学会第 35 回年会、2013.5.20-21 (早稲田大学西早稲田キャンパス)
- 7) Nomura, "Solid-state NMR Spectra of Pseudo GPI-anchored Proteins in membranes under Magic Angle Spinning." ERATO タンパク情報交換会、2013.5.16 (大阪大学豊中キャンパス) (招待講演)

[図書](計 1 件)

Nomura and Kusumoto, RSC Books, "Lipopolysaccharide Induces Raft Domain Expansion in a Cholesterol-Containing Membrane" in Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides. eds. F. Separovic and A. Naito, (査読有) London, U.K., Chapter 9, p.162-179

[その他]

ホームページ等
<http://www.sunbor.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 (野村) 薫 (MIURA, Kaoru)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・研究員
研究者番号: 9 0 3 5 3 5 1 5

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

島本啓子 (SHIMANOTO, Keiko)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・研究員
研究者番号: 7 0 2 3 5 6 3 8