

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670014

研究課題名(和文)HDL型脂質膜ディスクによる膜タンパク質配向制御技術の開発

研究課題名(英文)Development of HDL-like lipid membrane discs for reconstitution of membrane proteins

研究代表者

齋藤 博幸 (SAITO, Hiroyuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60300919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、血漿中での高密度リポタンパク質(HDL)形成・構造維持を担うアポA-Iタンパク質が、各種脂質と均一サイズの開放構造を有する脂質膜ディスクを人工的に形成することに着目し、(1)アポA-IのHDL型ディスク形成に関わる物理化学的原理の構築、(2)新規ナノディスク形成ペプチドの設計・開発、(3)膜タンパク質の配向制御を目的としたHDL型ディスクの固定化と反応評価系の構築、を行うことで、バイオセンサ・バイオリアクタ利用や1分子レベル構造機能解析に有用な新規HDL型膜ディスク/膜タンパク質再構成系の開発に向けた基盤構築を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed novel HDL-like lipid membrane disc system based on (1) physicochemical basis of formation of HDL-like discoidal particles by apoA-I protein, (2) design and development of novel nanodisc scaffold peptides. We also performed (3) immobilization of lipid membrane discs reconstituted with apoA-I on a sensor chip and examination of real-time interaction with anti-apoA-I antibody. These results provide useful information to application of HDL-like lipid membrane discs to bioreactor/biosensor, single molecule structural analysis, and reconstitution of membrane proteins.

研究分野：生物物理化学

キーワード：HDL 脂質膜ディスク アポA-I ペプチド 再構成 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜や細胞内膜系に存在する膜タンパク質は、膜を隔てた物質輸送やエネルギー生産・変換等の高度な機能を有しており、創薬分野におけるターゲットタンパク質としてのみならず、バイオリアクタやデバイスとしての産業利用が広く検討されている。

膜タンパク質の利用・応用を図るためのデバイス構築において、機能を低下させることなく化学的・物理的に安定な疎水性脂質膜環境に再構築することが必要である。さらに、膜タンパク質は存在する膜系に対して一方向的に配向することで物質輸送や刺激伝達機能等を発現しているため、その配向性を制御する技術が併せて重要となる。

しかしながら、界面活性剤ミセルや閉鎖小胞膜(ベシクル膜)に膜タンパク質を再構成する従来法は固定化時の配向制御が不能である。そのため、開放構造の微小膜系である bicelle( *Chem. Rev.* 2012)や膜ディスク(*FEBS Lett.* 584, 1720, 2010)の利用が近年提案されている。脂質膜ディスクは、ディスク膜骨格タンパク質の両親媒性ヘリックスが脂質二分子膜の疎水性エッジにベルト状に結合した構造をしており、微小な脂質膜領域に膜タンパク質などを組み込むことができる。閉鎖小胞(ベシクル膜)とは異なるこの開放二分子膜構造のため、物質輸送を担う膜タンパク質に特有なベクトル輸送機構を解析・利用する上で重要となる膜タンパク質の配向化が可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、血漿中での高密度リポタンパク質(HDL)形成・構造維持を担うアポリポタンパク質 A-I(アポ A-I)が、各種脂質と均一サイズの開放構造を有する脂質膜ディスクを人工的に形成することに着目し、(1)アポ A-Iの人工的改変によるディスクサイズ制御や構造安定性に優れた高機能化ディスク膜骨格タンパク質の創製、(2)安定人工脂質やディスク形成ペプチドの設計などの新たな脂質膜ディスク構成材料・方法論の開発、(3)膜タンパク質を脂質膜ディスクへ再構成・配向制御するための方法論の開発、を通して、バイオセンサ・バイオリアクタ利用や1分子レベル構造機能解析に有用な新規 HDL 型膜ディスク/膜タンパク質再構成系の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

野生型ヒトアポ A-I やその各領域欠損変異体、His-tag や biotin 残基を導入した改変アポ A-I は、遺伝子工学による変異の導入と大腸菌 BL21(DE3)株を用いた大量発現系によって作製した。アポ A-I 模倣フラグメントペプチドは Fmoc 固相合成法によって作製した。

アポ A-I タンパク質やペプチドとリン脂質や古細菌モデル脂質との複合体化による HDL 型脂質膜ディスクの作成は、主にコール酸透

析法によって行った。得られた脂質膜ディスクの形態は透過型電子顕微鏡観察により、粒子サイズや構造安定性は円偏光二色性や動的散乱測定、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、動的・熱力学的構造安定性は標識プローブの蛍光分光学的測定により、タグ付加ディスクの固定化と反応性評価はバイオレイヤー干渉法により、それぞれ評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) アポ A-I の HDL 型ディスク形成に関わる物理化学的原理の構築

従来、HDL 型脂質膜ディスクの形成には膜骨格タンパク質の脂質親和性が重要であることが知られていた。本研究では、膜骨格タンパク質アポ A-I 分子内の異なる領域を欠損させた変異体が形成する脂質膜ディスクの物性を比較評価することで、アポ A-I によるディスク形成の物理化学的原理構築を試みた。

分子内の各領域を欠損したアポ A-I 変異体( $\Delta 1-43$ 、 $\Delta 44-65$ 、 $\Delta 44-126$ 、 $\Delta 190-243$ )は、いずれもコール酸透析法によって 1-Palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine (POPC)と 9~10nm 程度のディスクを形成した。この際、形成された脂質膜ディスクの脂質保持能がアポ A-I 分子内のヘリックス形成アミノ酸残基数と良く相関することを見いだした(図1)。すなわち、分子内の様々な領域を欠損したアポ A-I 変異体のディスク形成能(脂質/タンパク質組成比)は、欠損した領域や長さに拘わらず構成アポ A-I 1分子当たりのヘリックス形成アミノ酸残基数と相関関係がみられ、その関係は HDL ディスクモデルから推定した理論曲線とよく一致した。したがって、アポ A-I のヘリックス構造形成性は、脂質膜ディスク形成におけるエネルギー(エントロピー)的駆動力だけでなく、微小膜環境を提供するディスクの脂質保持能も制御していることが明らかとなった。

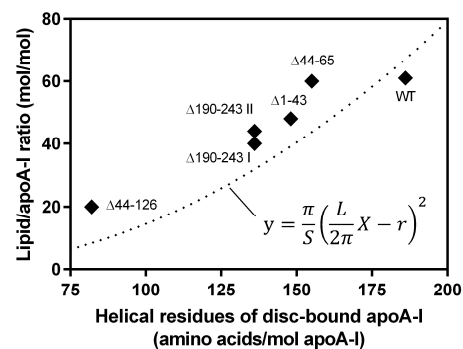


図1. 脂質膜ディスク中のアポ A-I ヘリックス残基数と脂質/タンパク質比の関係

また、環境感受性蛍光プローブである NBD で部位特異的に標識したアポ A-I を使い、ディスク形成アポ A-I 分子間の交換反応についての詳細な速度論的・熱力学的解析を行った。その結果、ディスク形成アポ A-I 分子は半減

期 10 分程度の動的交換反応状態にあり、エンタルピー的には不利だがエントロピー的には有利な遷移状態を経て結合・解離を繰り返していることが明らかとなった（図 2）。

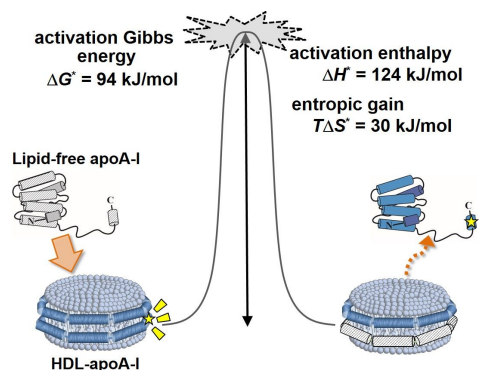


図 2. HDL 型ディスク結合アポ A-I と遊離アポ A-I との交換反応の動的エネルギー状態図

## (2) 新規ナノディスク形成ペプチドの開発

アポ A-I の高脂質親和性領域を模倣した新規ナノディスク形成ペプチド (Nanodisc Scaffold Peptide, NSP) を設計・開発した。これは、従来報告されていた 18 残基のアポ A-I 模倣両親媒性ペプチドを Pro 残基で二つなぎ、さらに C 末端側の疎水面に Phe 残基を導入した 37 残基からなるペプチドである。

コール酸透析法によりディスクを調製した結果、NSP はアポ A-I と異なり、調製時のペプチド/脂質比を調節することでディスクサイズ制御が可能であった。これは、1 分子でディスク周囲を 1 周覆うことによりディスクを形成するアポ A-I に対して、NSP は周囲を覆う分子数を変化させることでペプチド/脂質比に依存してサイズが変化するためと考えられる。作製したディスクの構造を電子顕微鏡により確認したところ、アポ A-I と同様の円盤状構造が確認された（図 3）。

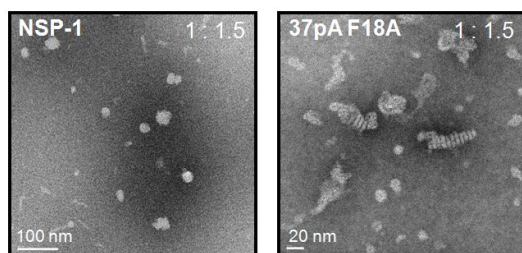


図 3. NSP/POPC ディスクの電子顕微鏡画像 (ペプチド/POPC 重量比 1:1.5 で作製)

さらに、NSP がコール酸などの界面活性剤を必要とせずに直接脂質膜を可溶化し HDL 型ディスクを形成することを新たに見だし、NSP が目的膜タンパク質をナノサイズの微小脂質膜環境に再構成するためのツールとして有用である可能性が示された。

## (3) 膜タンパク質の配向制御を目的としたディスクの固定化と反応評価系の構築

脂質膜ディスクの固定化・配向制御を目的

として、遺伝子工学的に His-tag や biotin 残基を導入した改変アポ A-I を新たに設計した。これらタグ付加アポ A-I による脂質膜ディスクの作成とセンサーチップ上への固定化並びにバイオレイヤー干渉法による抗アポ A-I 抗体との反応性評価を行ったところ、特に biotin 導入アポ A-I がセンサーチップ上への固定化ツールとして有用であることが示された（図 4）。

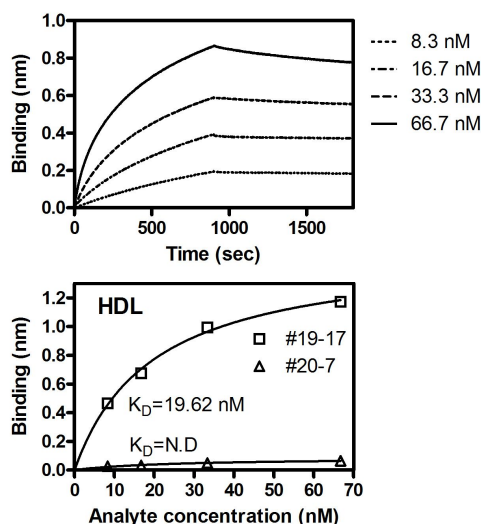


図 4. バイオレイヤー干渉法 (Octet RED 96 システム) による HDL 型ディスクと抗アポ A-I 抗体との結合反応のセンサーグラム (上図) と結合等温線 (下図)

## 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 9 件)

1. Trusova, V., Gorbenko, G., Girysh, M., Adachi, E., Mizuguchi, C., Sood, R., Kinnunen, P., and Saito, H. Membrane Effects of N-Terminal Fragment of Apolipoprotein A-I: A Fluorescent Probe Study. *J. Fluoresc.* 査読有, 25, 253-261 (2015)  
DOI: 10.1007/s10895-015-1501-9
2. Takechi-Haraya, Y., Tanaka, K., Tsuji, K., Asami, Y., Izawa, H., Shigenaga, A., Otaka, A., Saito, H., and Kawakami, K. Molecular complex composed of  $\beta$ -cyclodextrin-grafted chitosan and pH-sensitive amphipathic peptide for enhancing cellular cholesterol efflux under acidic pH. *Bioconjugate Chem.* 査読有, 26, 572-581 (2015)  
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00037
3. Handa, D., Kimura, H., Oka, T., Takechi, Y., Okuhira, K., Phillips, M. C., and Saito, H. Kinetic and Thermodynamic Analyses of Spontaneous Exchange between High Density Lipoprotein-Bound and Lipid-Free Apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 査読有,

- 54, 1123-1131 (2015)  
DOI: 10.1021/bi501345j
4. Mizuguchi, C., Hata, M., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., and Saito, H. Fluorescence Study of Domain Structure and Lipid Interaction of Human Apolipoproteins E3 and E4. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 査読有, 1841, 1716-1724 (2014)  
DOI: 10.1016/j.bbali.2014.09.019
  5. Omura, R., Nagao, K., Kobayashi, N., Ueda, K., and Saito, H. Direct Detection of ABCA1-dependent HDL Formation Based on Lipidation-induced Hydrophobicity Change in ApoA-I. *J. Lipid Res.* 査読有, 55, 2423-2431 (2014)  
DOI: 10.1194/jlr.D049445
  6. Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Mizuguchi, C., Watanabe, M., Saito, H., Phillips, M. C., and Lund-Katz, S. Influence of Domain Stability on the Properties of Human Apolipoprotein E3 and E4 and Mouse Apolipoprotein E. *Biochemistry* 査読有, 53, 4025-4033 (2014)  
DOI: 10.1021/bi500340z
  7. Adachi, E., Kosaka, A., Tsuji, K., Mizuguchi, C., Kawashima, H., Shigenaga, A., Nagao, K., Akaji, K., Otaka, A., and Saito, H. The Extreme N-terminal Region of Human Apolipoprotein A-I Has a Strong Propensity to Form Amyloid Fibrils. *FEBS Lett.* 査読有, 588, 389-394 (2014)  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.031
  8. Girysh, M., Gorbenco, G., Trusova, V., Adachi, E., Mizuguchi, C., Nagao, K., Kawashima, H., Akaji, K., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Saito, H. Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils of Apolipoprotein A-I N-terminal Fragment: Resonance Energy Transfer Study. *J. Struct. Biol.* 査読有, 185, 116-124 (2014)  
DOI: 10.1016/j.jsb.2013.10.017
  9. Nagao, K., Hata, M., Tanaka, K., Takechi, Y., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Saito, H. The roles of C-terminal helices of human apolipoprotein A-I in formation of high-density lipoprotein particles. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 査読有, 1841, 80-87 (2014)  
DOI: 10.1016/j.bbali.2013.10.005

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 三河志穂, 水口智晴, 辻耕平, 馬場照彦, 重永章, 大高章, 齋藤博幸, アルギニン変異 apoA-I フラグメントのアミロイド線維形成性、日本薬学会第 135 年会、2015.3.26-3.28、神戸サンボホール(兵庫県・神戸市)
2. 木村仁, 原矢佑樹, 小林典裕, 齋藤博幸,

- バイオレイヤー干渉法を用いた人工 HDL 粒子と抗 apoA-I 抗体との相互作用評価、日本薬学会第 135 年会、2015.3.26-3.28、神戸サンボホール(兵庫県・神戸市)
3. 杉原涼, 長尾耕治郎, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, ヒトアポ A-I 結合タンパク質 AIBP の大腸菌発現系の構築と細胞内局在、日本薬学会第 135 年会、2015.3.26-3.28、神戸サンボホール(兵庫県・神戸市)
  4. 水口智晴, 端 茉美, Phillips, M.C., Lund-Katz, S., 齋藤博幸, トリプトファン変異導入によるアポ E アイソフォームのニドメイン構造の比較評価、日本薬学会第 135 年会、2015.3.26-3.28、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)
  5. 堀江有紀, 土屋沙織, 大山浩之, 小林典裕, 齋藤博幸, アミロイドーシスの病態解明を目指した ApoA-I モノクローナル抗体の作製、日本薬学会第 135 年会、2015.3.26-3.28、神戸サンボホール(兵庫県・神戸市)
  6. Takechi Y., Yanagisawa Y., Nishitsuji K., Uchimura K., Kawakami T., Kawakami K., Okuhira K., Saito H. Arginine-Glycosaminoglycan Interaction Regulates Penetration Efficiency of Arginine-rich Cell-penetrating Peptides in Biological Membrane. Biophysical Society 59<sup>th</sup> Annual Meeting, 2015.2.7-2.11 (Baltimore, Maryland, USA)
  7. 武知佑樹, 柳澤悠登, 西辻和親, 川上徹, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, アルギニンペプチドの細胞膜透過性に与えるグリコサミノグリカン糖鎖相互作用の影響、膜シンポジウム 2014、2014.11.26-11.27、神戸大学(兵庫県・神戸市)
  8. 武知佑樹, 柳澤悠登, 西辻和親, 川上徹, 川上巨作, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, カチオン性ペプチドの細胞膜透過促進機構～アルギニンペプチドのグリコサミノグリカン糖鎖への特異的結合による α-ヘリックス構造形成～、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳島大学(徳島県・徳島市)
  9. 大村理紗, 長尾耕治郎, 齋藤博幸, 環境感受性蛍光プローブ標識アポ A-I を利用した新規 HDL 形成検出法の開発、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳島大学(徳島県・徳島市)
  10. 半田大祐, 岡辰也, 武知佑樹, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, HDL アポ A-I の自発的交換反応に関する速度論的・熱力学的解析、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳島大学(徳島県・徳島市)
  11. 水口智晴, 端 茉美, Phillips, M.C., Lund-Katz, S., 齋藤博幸, 部位特異的蛍光標識によるアポ E アイソフォームの脂質結合挙動の解析、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳

- 島大学(徳島県・徳島市)
12. 新村航, 假屋園大和, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, ApoA-I 欠損変異体を用いたナノディスクの作製及び物性評価、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳島大学(徳島県・徳島市)
  13. 桑原香織, 西辻和親, 小林典裕, 内村健治, 坂下直実, 齋藤博幸, ApoA1 アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響、第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014.11.20-11.21、徳島大学(徳島県・徳島市)
  14. 假屋園大和, 新村航, 辻耕平, 重永章, 大高章, 齋藤博幸, DESIGN OF NANODISC SCAFFOLD PEPTIDE (NSP)、第 51 回ペプチド討論会、2014.10.22-10.24、徳島大学(徳島県・徳島市)
  15. 武知佑樹, 柳澤悠登, 西辻和親, 川上徹, 奥平桂一郎, 齋藤博幸, ROLE OF GAG INTERACTION IN BIOLOGICAL MEMBRANE PENETRATION OF ARGinine-RICH CELL-PENETRATING PEPTIDE、第 51 回ペプチド討論会、2014.10.22-10.24、徳島大学(徳島県・徳島市)
  16. 武知佑樹, 安岐健三, 通山由美, 川上徹, 齋藤博幸, 岡村恵美子, In cell NMR によるオクタアルギニンペプチドの細胞内輸送のリアルタイム計測と速度論、第 65 回コロイドおよび界面化学討論会、2014.9.3-9.5、東京理科大学(東京都・新宿区)
  17. Takechi, Y., Aki, K., Tohyama, Y., Kawakami, T., Saito, H., Okamura, E. Real Time in-Cell <sup>19</sup>F NMR Spectroscopy on the Cell Membrane Permeation of Octaarginine. International Conference on Magnetic Resonance for Biological Systems 2014, 2014.8.24-8.29 (Dallas, Texas, USA)
  18. 桑原香織, 西辻和親, 小林典裕, 内村健治, 坂下直実, 齋藤博幸, ApoA1 アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響、第 2 回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2014.8.22、KKR ホテル東京(東京都・千代田区)
  19. 武知佑樹, 水口智晴, 川上徹, 齋藤博幸, MicroCal iTC200 による細胞膜透過ペプチド - 糖鎖間相互作用の熱力学的解析、GE Life Sciences Day 2014、2014.8.1、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  20. 武知佑樹, 安岐健三, 通山由美, 川上徹, 齋藤博幸, 岡村恵美子, オクタアルギニンの物理的膜透過に関するリアルタイム in cell NMR 研究、日本膜学会第 36 年会、2014.5.12-5.13 早稲田大学(東京都・新宿区)
  21. 足立愛美, 辻耕平, 川島浩之, 重永章, 長尾耕治郎, 赤路健一, 大高章, 齋藤博幸, フラグメントペプチドを用いたアポ A-I アミロイド線維形成領域の同定、日本薬学会第 134 年会、2014.3.28-3.30、熊本大学(熊本県・熊本市)
  22. 長尾耕治郎, 大村理紗, 齋藤博幸, Apolipoprotein A-I 周囲環境変化に着目した新規 HDL 形成測定法の開発、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014.3.27-3.30、明治大学(神奈川県・川崎市)
  23. 水口智晴, 足立愛美, 川島浩之, 長尾耕治郎, 赤路健一, 齋藤博幸, アミロイドーシス変異アポ A-I の線維形成に及ぼす脂質膜の影響、第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013.11.21-11.22、東京大学(東京都・文京区)
  24. 長尾耕治郎, 端茉美, 田中健斗, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸, HDL 形成における apolipoprotein A-I の C 末端領域の機能、膜シンポジウム 2013、2013.11.7-11.8、京都府立医科大学(京都府・京都市)
  25. 馬場照彦, 高木俊之, 金森敏幸, 岡辰也, 齋藤博幸, Interaction of heavy metal ions with artificial tetraether-type phospholipid membranes. 第 51 回日本生物物理学会年会、2013.10.28-10.30、京都国際会議場(京都府・京都市)
  26. 大村理紗, 長尾耕治郎, 齋藤博幸, 環境感受性プローブを用いた新規 HDL 形成評価法の開発、第 52 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2013.10.26、松山大学(愛媛県・松山市)
  27. 田中健斗, 端茉美, 長尾耕治郎, Lund-Katz, S., Phillip, M.C., 齋藤博幸, HDL 形成における apoA-I の C 末端領域の役割、第 52 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2013.10.26、松山大学(愛媛県・松山市)
  28. 星川梢, 辻野奈緒美, 田中将史, 齋藤博幸, 向高弘, アポ E 含有脂質ナノディスクの腫瘍細胞への集積性評価、第 63 回日本薬学会近畿支部大会、2013.10.12、同志社女子大学(京都府・京田辺市)
- 〔その他〕  
研究室ホームページ：  
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/szi/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
齋藤 博幸 (SAITO, Hiroyuki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：60300919
  - (2) 研究分担者  
馬場 照彦 (BABA, Teruhiko)  
独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員  
研究者番号：40357794
  - (3) 連携研究者

長尾 耕治郎 (NAGAO, Kohjiro)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：40587325

川上 徹 (KAWAKAMI, Toru)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号：70273711