

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 4 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 公益財団法人サントリー生命科学財団  
 職 名 研究員  
 研究代表者名 野村薫

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281008 )

1. 共同利用研究 課題名	会合体形成により機能を果たす膜蛋白質の人工膜を用いた蛍光顕微鏡解析			
2. 共同利用研究 目的	脂質二重膜上で会合体を形成することにより機能を果たす2種類の膜蛋白質に注目し、その膜上における会合体形成を明らかにするために、パターン化人工膜にこれらの蛋白質を再構成し、蛍光顕微鏡を用いて解析する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 野村 薫	公益財団法人サントリー生命科学財団	研究員	研究全般の推進	
(分担研究者) 森垣 憲一	神戸大学バイオシグナル総合研究センター	准教授	人工膜を用いた会合体解析	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答部 門・環境物質応答分野	氏 名	森垣 憲一

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281008)

## 6. 共同利用研究計画

イモリの肢再生に関係する蛋白質 Prod1 と、蛋白質の膜挿入や膜外への分泌を担うチャネル複合体(トランスロコン)である SecYEG のうちの SecG について、①蛋白質の調製、②パターン化人工膜への再構成、③蛍光顕微鏡による会合挙動解析を行う。そのうち、②および③については、神戸大学バイオシグナル総合研究センターの設備を利用する。

①Prod1 には合成したアンカーを SortaseA 酵素により連結させるための認識配列と His-tag を、SecG には Frag-tag をそれぞれC末端に繋げたプラスミドを用いて大腸菌の大量培養系で発現後、精製を行う。②蛍光顕微鏡で観測するために両方の蛋白質を蛍光試薬で標識する。その後、Prod1 は合成した脂質アンカーをあらかじめ挿入済みパターン化膜に SortaseA を用いて連結させることで膜へ再構成する。SecG は平面膜にそのまま導入することで再構成する。③人工膜での会合挙動は蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観察で行う。

## 7. 共同利用研究の成果

### Prod1

イモリの肢再生制御蛋白質 Prod1 において、GPI アンカー部分は位置情報の規定や、正確な組織形成に欠かせない。GPI アンカー型蛋白質は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる糖脂質が蛋白質のC末端に翻訳語修飾された膜蛋白質であり、我々の体内で重要な役割を担っているが、GPI アンカーが付加した状態で必要量発現精製することは難しいため、これまでに膜存在下における蛋白質の立体構造、運動性、相互作用等の原子レベルでの解析は他の膜蛋白質のように行われていない。そこで我々は、SortaseA 酵素を用いて擬似的な GPI アンカー型 Prod1 の調製を行い、Prod1 のアンカリングの機能解明を試みた。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、蛋白質部分は動きが抑えられていた。さらに、蛍光標識したアンカー型 Prod1 を支持二重膜に挿入して、Prod1 の局在を蛍光顕微鏡で観測し、数百個の Prod1 から成る会合体が形成されることにより運動性が低下したことを明らかにした。次に、会合時における蛋白質構造の変化を膜に再構成した GPI アンカー型 Prod1 の  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  関連固体 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。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蛍光顕微鏡と動的散乱実験より明らかになった。これらの結果から、アンカーは Prod1 同士を凝集させ、さらにこの凝集により Prod1 が膜界面だけではなく他の膜上の Prod1 とも会合することで、Prod1 を介した膜同士の接合も誘起することを明らかにした。

### SecG

膜タンパク質の膜挿入を担う SecYEG トランスロコン複合体のうち、SecG の発現ベクターを構築し、大腸菌に発現させた。このタンパク質を精製し、大腸菌膜に再構成して固体 NMR を測定したが、タンパク量が少なく SecG のシグナルが得られなかった。Sec の調製は難しいと判断し、トランスロコン非依存系にターゲットを変更する事とした。

## 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

### 【研究論文発表】

Nomura K., Tanimoto Y., Hayashi F., Harada E., Shan X. Y., Shionyu M., Hijikata A., Shirai T., Morigaki K., Shimamoto K. "The Role of the Prod1 Membrane Anchor in Newt Limb Regeneration." *Angew Chem Int Ed Engl.* (2017) vol. 56, p. 270-274

### 【学会発表】

#### 国際学会

Nomura K., Tanimoto Y., Hayashi F., Harada E., Shan X. Y., Morigaki K., Shimamoto K. "The Role of Anchor in the Prod1 essential in Newt Limb Regeneration" The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS-2016) 8.21-26 (Kyoto, Japan)

#### 国内学会

野村, 谷本, 林, 原田, 単, 森垣, 島本. "固体 NMR を用いたイモリの肢制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明." 第 55 回 NMR 討論会 11. 15-18 (広島)

9. 共同利用研究に関連した受賞, 博士学位論文の取得, 大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

特にありません。