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 30 年 4 月 10 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29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 29 年 4 月 1 日　～　平成 30 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

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に依存しない“トランスロコン非依存的な膜挿入”において、すべての膜挿入経路に必須の膜挿入因子である“MPIase”が果たす役割を解明するために、蛍光顕微鏡を用いて MPIase の膜上における会合体形成を観測する。MPIase は GlcNAc、ManNAcA、Fuc4NAc の3糖ユニットの繰り返しからなる糖鎖構造(n=9-11)と脂質部がピロリン酸を介して結合した構造を持つ糖脂質である。リボゾームで合成された新生蛋白質が凝集せずに膜の中に挿入されるには何らかのサポートが必要であり、我々は MPIase の糖鎖が蛋白質の凝集を抑制するものと推定している。一般に糖鎖の相互作用は弱いために、糖鎖が集まってクラスターを形成していることが知られている。MPIase でも膜上で糖鎖が会合している可能性があるが、現時点ではその証拠が得られていない。MPIase の糖鎖を蛍光標識しておき、平面膜の顕微鏡観測を行うことで、会合状態を検証する。実験は以下の手順で進める。①MPIase を蛍光標識する。②ガラス基板表面に大腸菌由来脂質からなる脂質二重膜の平面膜を作成する。その上から蛍光標識した MPIase を導入し、MPIase の会合状態を蛍光顕微鏡を用いて一分子レベルで観測する。③さらに基質蛋白質を導入し、基質蛋白質の存在による MPIase の会合状態の変化を観測することで、MPIase と基質蛋白質の相互作用を解析する。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。

7. 共同利用研究の成果

蛍光顕微鏡を用いた脂質二重膜上における MPIase の会合体を形成の観測

大腸菌から精製できる天然の MPIase の量は限られているため、天然 MPIase の蛍光標識(①)が計画通りに進まず、研究期間内に蛍光顕微鏡を用いて解析する段階まで至らなかった。我々は最近 MPIase の活性の最小単位である mini-MPIase(図2のアミノ糖ユニットが一つの)の合成に成功し活性があることを確認したので、天然 MPIase よりも多くの供給が見込めるこの mini-MPIase を用いて実験を進める方針に切り替えることにした。mini-MPIase の合成は難易度の高いものであり、合成にはそれなりに時間が掛かるものの、大量供給が見込めることに合わせて、3糖目のフコサミンのアリル基をアミンリンカーに変換する事で蛍光官能基を導入しやすくし、蛍光官能基の最適化を行えるというメリットもある。現在は mini-MPIase の合成中であり、試料調製が出来次第、蛍光顕微鏡を用いた解析に着手する予定である。

ジアシルグリセロール(DAG)や MPIase が脂質膜の側方拡散速度に与える影響の解析

MPIase は膜挿入因子である一方、ジアシルグリセロール (DAG) は膜挿入の抑制因子である。“トランスロコン非依存的な膜挿入過程”により膜挿入する膜蛋白質は、大腸菌のリン脂質のみで出来た人工的リポソームに MPIase が存在しなくても自発的に膜挿入するが、この膜に DAG が存在すると、自発的膜挿入は抑制される。さらに、この DAG 含有リポソームに MPIase を加えると、膜蛋白質の膜への挿入は膜含有 MPIase の濃度依存的に増加する。従って、DAG と MPIase の膜中における存在が膜物性に及ぼす影響を比較することにより、膜挿入抑制および促進の分子機構を明らかにすることができるのではないかと考えた。膜物性としては、①膜の形態、②リン脂質のアシル鎖の配向性、③パッキング、④頭部のしなやかさ、そして⑤側方拡散係数等の膜の運動性に与える影響、⑥DAG 自身のフリップフロップ運動への MPIase の影響や⑦MPIase 自身の運動性を解析した。このうち、⑤の側方拡散係数の解析を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して行った結果、DAG の存在下では、側方拡散速度は劇的に減少したが、mini-MPIase は脂質膜の側方拡散速度には影響を与えなかった。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

【学会発表】

国際学会

Nomura†. “The Role of Membrane Anchor in Prod1 for the Newt Limb Regeneration” International seminar on biophysics and chemical biology of biomembrane and lipid bilayers 10.9-10, 2017 (Osaka, Japan)

国内学会

1)野村†, 谷本, 林, 原田, 単, 土方, 塩生, 白井, 森垣, 島本. 固体ＮＭＲを用いたイモリの肢再生制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明. 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 10.26-27, 2017（金沢）

2)野村†. 固体ＮＭＲを用いたイモリの肢再生制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明. 生有研シンポジウムユニークな生命現象の解明を目指した「新しい鍵物質」の創製 11.28, 2017（京都）

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。

特になし。