

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 31年 4月 30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 主席研究員  
 研究代表者名 野村薫

下記のとおり平成30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	トランスロコン非依存膜挿入経路における MPIase の作用機構の解明			
2. 共同利用研究 目的	膜挿入因子である MPIase の役割を明らかにするため、支持二重膜に MPIase や基質蛋白質を再構成し、蛍光顕微鏡を用いて MPIase 局在や会合状態を解析する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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	主席研究員	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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

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る。我々は大腸菌の膜蛋白質を膜に挿入する際に必須の因子 MPIase を同定し(図1)、チャネル複合体(トランスロコン)非依存的な膜挿入 (図1b)において、“MPIase”が果たす役割の解明を目指している。本研究では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3糖ユニットの繰り返しからなる糖鎖構造(アミノ糖ユニット 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(図2)。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。さらに基質蛋白質が存在したことによる、MPIase の局在の変化も観測する。基質蛋白質としては、トランスロコン非依存的挿入のモデルとして活性測定に広く使われているバクテリオファージのコート蛋白質 P3 を用いる。また、蛍光標識 MPIase の一分子追跡も行い、基質蛋白質との相互作用と MPIase の凝集を MPIase の膜上における局在と側方運動の両面から解析する予定である。

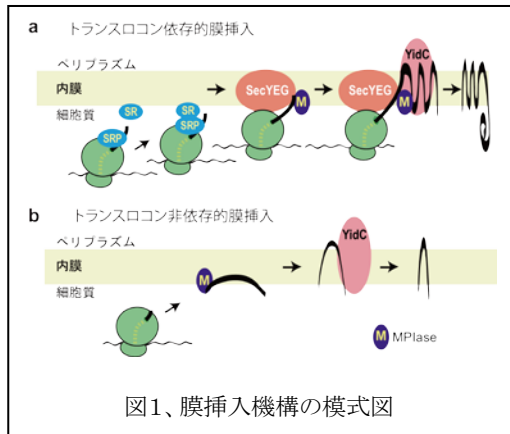


図1、膜挿入機構の模式図

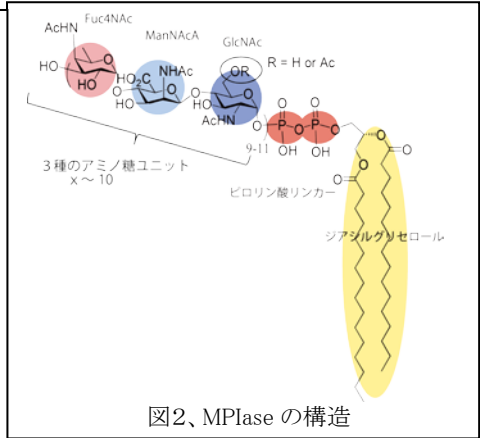


図2、MPIase の構造

7. 共同利用研究の成果

蛍光標識 3 糖ピロリン脂質(FL-mini-MPIase-3)の合成

我々は最近 MPIase の活性の最小単位である mini-MPIase-3 (図2のアミノ糖ユニットが一つの MPIase の最小活性ユニット)の合成に成功し、活性があることを確認した。mini-MPIase-3 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が、大量供給が見込めるため、MPIase の蛍光標識体としては、この合成 mini-MPIase-3 の蛍光標識体を用いることとした。Mini-MPIase-3 の 3 糖目のフコサミンの 3 位水酸基にリンカー(PEG4、PEG8、PEG12、C6 アルキル)をつなげ、ここに蛍光官能基を導入し、4 種類の蛍光標識 3 糖ピロリン脂質(FL-mini-MPIase-3)を合成した。

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

E.Coli 脂質で作成したパターン化平面膜に Cy7-PEG8-mini-MPIase-3 を導入し、多分子、一分子の Cy7-PEG8-mini-MPIase-3 を観察した。ベシクル溶液にカルシウムを添加することで、基板表面に E.Coli 脂質の平面膜を形成することができた。E.Coli 脂質平面膜内で Cy7-PEG8-mini-MPIase-3 は、均一に存在して側方拡散しており、巨大な凝集体などは観察されなかった。今後、MPIase やペプチドを添加することによって凝集挙動がどのように変化するか検討する予定である。

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。)

国内学会

野村<sup>†</sup>, 谷本, 林, 原田, 単, 土方, 塩生, 白井, 森垣, 島本. イモリの肢制御蛋白質における細胞膜への脂質アンカリングの役割解明. 日本膜学会第40年会, 5. 8-9, 2018 (東京)

【研究論文発表】

K. Nomura,\* T. Yamaguchi, S. Mori, K. Fujikawa, K.I. Nishiyama, T. Shimanouchi, Y. Tanimoto, K. Morigaki, and K. Shimamoto\*, “Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration.” Biophysical Journal, submitted.

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。

科研費 基盤研究(C)平成 30~32 年度で採択。

(課題名)膜タンパク質膜挿入における糖脂質 MPIase のシャペロン様・酵素様活性機構の解明