

平成 27 年度工学系共通経費による顕彰と研究助成 成果報告書

所 属	理工学研究科 化学工学専攻
研究者 (ふりがな)	田中 祐圭 (たなか まさよし)
タイトル	生体膜曲率プロテオスイッチ技術による生体膜曲率認識タンパク質の同定と解析
助 成 名	工系若手奨励賞
採択金額	70万円

研究の背景

ヒトを含む真核生物の細胞は、小胞輸送と呼ばれるダイナミックな生体膜の輸送経路を介して、タンパク質や核酸などを目的の部位に輸送する。この小胞輸送バイオプロセスは、細胞機能や疾病に深く関与し、様々なタンパク質の機能により精密に制御されている。特に、細胞などの平面様の生体膜から曲率の大きい生体膜小胞を形作る上で、生体膜の変形能や凹凸 (曲率) 認識能を持つタンパク質が重要な役割を果たすことが知られている。一方で、すでに報告されている曲率認識タンパク質 (またはドメイン) の種類では、細胞内で見られる生体膜小胞の多様性と大きな隔りがあるため、未知の曲率認識能を持つタンパク質が多数存在することが示唆されている。そのため、小胞輸送分子機構の解明や新たなバイオマーカーの探索に向け、効率的な曲率認識タンパク質の同定技術の開発が求められている。

結果と考察

サイズの異なる球形材料を脂質膜で被覆することで、異なる曲率を持つ生体膜を作製する。この異なる曲率をもつ生体膜材料に対して、生体試料から得られるタンパク質群との比較相互作用解析を行うことで、効率的な曲率認識タン

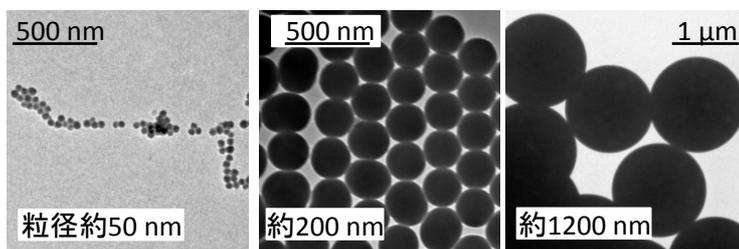


図 1 サイズ制御された球形 SiO₂ 粒子の透過型電子顕微鏡像

パク質の同定技術を開発する。そこで、まずサイズの異なる球形材料を合成するため、SiO₂ 粒子の合成条件について、特に反応温度、溶媒、基質濃度などの検討を行なった。その結果、図 1 に示される通り、非常に均一な粒径を示す 50 nm から数 μm 程度までの球形 SiO₂ 粒子が合成できることが示された。

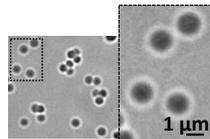
次に、得られた球形の SiO₂ 粒子を生体膜で被覆する条件の検討を行なった。微生物由来の脂質モデルとして一般に用いられる POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho choline) を利用し、平均粒径 1.2 μm の SiO₂ 粒子を被覆した。蛍光観察を行う際には POPC に蛍光標識脂質 (TexasRed-DHPE, 0.1%) を添加し、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて SiO₂ 粒子への脂質成分の被覆条件を検討した。ここでは特に、粒子表面積と用いる脂質成分の分子数や洗浄条件の検討を行なった。図 2 に示される通り、得られた生体膜被覆 SiO₂ 粒子の蛍光顕微鏡観察から、全ての SiO₂ 粒子に対して均一に生体膜が被覆できていることが確認された。また水溶液に脂質を添加した際に一般的に見られる人工生体膜構造 (リポソーム) や脂質の凝集体などは確認されなかったことから、精製度の高い生体膜材料を取得できたことが示唆された。また SEM を用いた観察からも、被覆していない粒子との比較から明らかのように、様々な曲率をもつ SiO₂ 粒子が生体膜により均一に被覆され、曲率認識能を有するタンパク質の探索に利用できる生体膜被覆材料を創出できることが確認された。

ここで得られた異なる曲率を持つ生体膜材料を利用した曲率認識タンパク質の効率的な同定技術を開発するためには、既知のモデル曲率認識タンパク質を用い、系を最適化する必要がある。そこで、曲率認識タンパク質として知られる真核及び原核生物由来の複数のタンパク質について、大腸菌を用いた発現系の確立及び精製条件の検討を行った。その結果、曲率認識タンパク質として知られる MamY, Centaurinβ2, Amphiphysin タンパク質の発現、及び精製条件を定めることに成功した (表)。

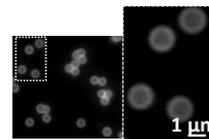
表 曲率認識タンパク質の発現及び精製条件

Target protein	MamY	Centaurinβ2	Amphiphysin
Protein expression condition			
Temperature (°C)	20	25	20
IPTG concentration (mM)	0.05	0.5	0.5
Protein purification methods	First	Size-exclusion chromatography	-
	Second	Glutathione sepharose column	
	Third	Glutathione sepharose column	
	Final	Size-exclusion chromatography	Anion exchange chromatography

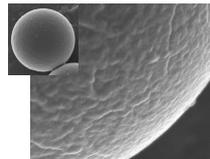
位相差顕微鏡像



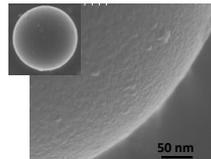
蛍光顕微鏡画像



走査型電子顕微鏡画像



脂質被覆有り



脂質被覆無し

図 2 生体膜被覆 SiO₂ 粒子の観察

結論と今後の課題

本研究期間において、以下の成果が得られた。

- ・ 50 nm から数 μm 程度までの異なる球形に制御できる SiO₂ 粒子合成条件を確立
- ・ 得られた SiO₂ 粒子に対して生体膜を均一に被覆可能な条件を確立
- ・ モデル曲率認識タンパク質の獲得

今後は、ここで得られたモデルタンパク質と作製した異なる曲率を持つ生体膜被覆材料との相互作用解析条件を最適化した後、生体サンプルからの新規曲率タンパク質の同定を試みる。また疾患に関与する曲率認識タンパク質の同定に向け、疾患サンプルと健者サンプルの比較解析を行い、例えば、疾患サンプルにのみ存在し、且つ曲率の異なる生体膜に対して親和性に違いがあるタンパク質を同定する。これにより、これまで不明であった小胞輸送プロセスの理解が進むだけでなく、疾患に関与する新たなバイオマーカーの発見につながると期待される。

使用内訳書

費目	内訳	金額
備品 1	ノートパソコン	175,800
備品 2		
消耗品	脂質や材料合成試薬など	475,078
旅費		
その他	大岡山分析支援センター利用料など	49,122
合計		700,000

記入上の注意：

備品は、品名ごとに記入。

差額が生じた場合は、消耗品で調整。

消耗品を購入しなかった場合は、経費の差額と補填した予算科目名を合計額の内訳欄に記入。