

「パターン化脂質膜を用いた G タンパク質共役型受容体のラフト親和性解析」

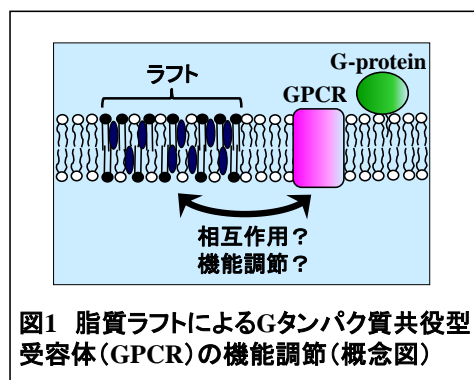
神戸大学 自然科学系先端融合研究環境遺伝子実験センター

森垣 憲一

1 研究の背景と目的

生体膜は、細胞と周辺環境との界面として機能するだけでなく、細胞内においても多様な機能を担っている。生体膜機能の変調は疾患につながり、医薬品の大部分が生体膜機能を制御することで薬効を発現している。生体膜は、極めて複雑で動的な構造を持ち、特にコレステロールと飽和脂質が濃縮した微小で短寿命の膜ドメイン（ラフト）は、膜タンパク質の局在や機能調節に大きな役割を果たすものと考えられている(1)。しかし、ラフトが膜機能に果たす役割は未解明である。細胞膜で多様な信号を受容し、医薬品の主要標的分子である G タンパク質共役型受容体（GPCR）も、その機能にラフトが関わると考えられている。しかし、ラフトの微小さと動的変化が GPCR のラフトとの相互作用や機能調節メカニズムの検証を困難にしている（図 1）。

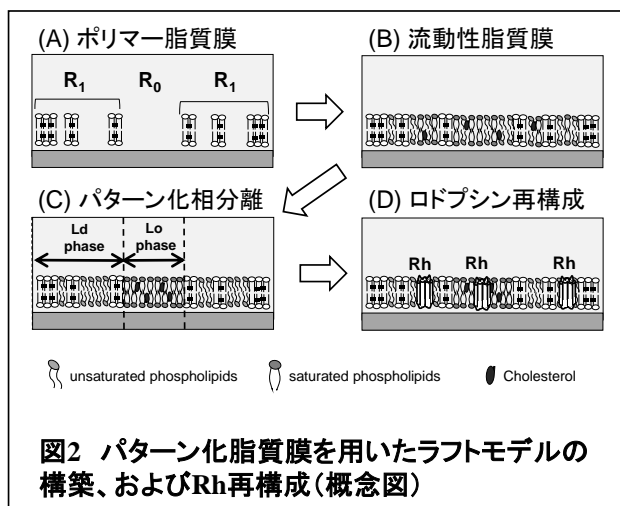
我々は、生体膜のモデル系として、ガラス基板にパターン化脂質膜を作製する技術を世界的にもユニークな独自技術として確立してきた(2)。そして、生体膜のラフト・非ラフト膜領域をパターン化する技術を確立した(3)。本研究では、ガラス基板に固定化したラフト・非ラフト領域を持つ人工膜（パターン化脂質膜）を用いて、ラフトへの GPCR の結合（ラフト親和性）を定量的に測定する技術を開発することを目的とした。GPCR としては、G タンパク質との共役機構が良く研究され、活性制御の容易な光受容体ロドプシンを用いた。これまで生化学的手法による定性的な知見しか得られていなかったロドプシンのラフト親和性を定量測定し、光受容機能に対するラフトの影響を定量的に評価する技術を確立することを目指した。



2 研究方法・研究内容

(1) パターン化脂質膜の作製：生体膜をガラス基板に再現したパターン化脂質膜を作製した。そのために、光重合性リン脂質（1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine : DiynePC）二分子膜を基板表面に累積し、光リソグラフィー技術を利用して特定のパターンで紫外光重合することで安定な枠組みとなるポリマー脂質膜を作製した（図 2）。モノマー脂質を除去した部分に生体膜由来の脂質膜(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (Chol)) を組み込んで、ポリマー脂質膜と組み合わせることで、(a) 主に DPPC と Chol からなるラフト膜領域（Liquid ordered: Lo 相）が濃縮した流動性脂質膜 (R₀)、(b) 主に DOPC からなる非ラフト膜領域（Liquid-disordered: Ld 相）とポリマー脂質が混合された部分重合膜 (R₁)、の 2 領域を形成した。

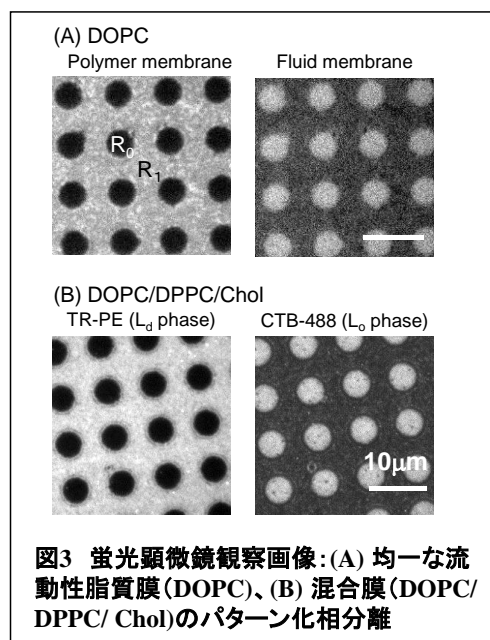
(2) パターン化脂質膜へのロドプシン (Rh) 再構成: Rh の調製はウシガエル (*Rana catesbeiana*) 桿体外節を octylglucoside で可溶化後、Con-A カラムを用いて行った。基板表面にあらかじめ脂質膜を形成しておき、界面活性剤で可溶化した Rh を加えて膜内に Rh を導入した。Rh および Gt の計測は、全反射照明による蛍光 1 分子観察を用いて行った。Rh は、蛍光標識された Rh もしくは C 末端に特異的な Fab 抗体を用いた。Rh の機能は、光照射で活性化した Rh (Rh*) に G タンパク質トランスデュシン (Gt) が結合すること、さらに GTP を加えると Gt が Rh より再解離することから確認した。



(3) Rh のラフト親和性評価: Rh および Gt のラフト親和性を、パターン化脂質膜における Lo 相・Ld 相への分配から評価した。流動性脂質膜には Lo 相 (ラフト領域)、部分重合膜部位には Ld 相が存在するので、それぞれの領域での Rh、Gt 存在密度より Lo 相/Ld 相間の分配を測定しラフトへの親和性の指標とした。(Ld 相への局在が既に分かっている蛍光標識脂質 (TR-PE) を分配を評価する参照分子として用いた。

3 研究成果

DiynePC を光リソグラフィー技術で局所的に重合したパターン化脂質膜は、紫外光照射量を調節することで、ポリマー脂質膜と流動性脂質膜とが数十ナノメートルのドメインとして混在する部分重合領域を形成することができる(4)。DOPC のみからなる脂質膜を導入すると、脂溶性蛍光色素 (TR-PE) の蛍光が流動性脂質膜のみからなる領域 (R₀) でより強く観察された (図 3 (A))。一方、3 種類の脂質 (DOPC/DPPC/Chol) の混合脂質膜を導入すると、部分重合膜領域 (R₁) でより強い TR-PE 蛍光が観察された (図 3 (B))。TR-PE は非ラフト膜領域 (Ld 相) に局在することが知られており、ラフト膜領域 (Lo 相) が流動性脂質膜 (R₀) に濃縮し、非ラフト膜領域 (Ld 相) が部分重合膜 (R₁) に濃縮するという、パターン化相分離が確認された。



ラフト膜領域 (Lo 相) と非ラフト膜領域 (Ld 相) が相分離したパターン化脂質膜に、Rh および Gt 再構成を再構成した。Gt は三量体 G タンパク質であり、 α , γ の二つのサブユニットに脂質修飾がされている。水溶液中に加えられた Gt は膜に結合し、膜表面で側方拡散することが 1 分子蛍光顕微鏡観察より示された。図 4 は、Gt の軌跡 (黄色い線)

と TR-PE 蛍光 (Ld 相の分布) を示したものである。TR-PE 蛍光が見られない球形の部分には、Lo 相が濃縮されている。従って、Gt が Lo 相と Ld 相の間を自由拡散していることが分かる。一方、Rh は 7 回膜貫通型タンパク質であり、大きな疎水性ドメインを持つため、界面活性剤で可溶化された状態のタンパク質を水溶液に加えて、界面活性剤濃度を急速に低下させることで膜への組み込みを行った。再構成を行うセルの形態、タンパク質 (Rh)、脂質、界面活性剤の濃度 (および相対比)、溶液攪拌、などの実験条件を最適化することで、Rh 分子の凝集を防ぎ膜に再構成することができた。図 4 に示されるように、Rh が Lo 相と Ld 相の間を自由拡散していることが観察された。

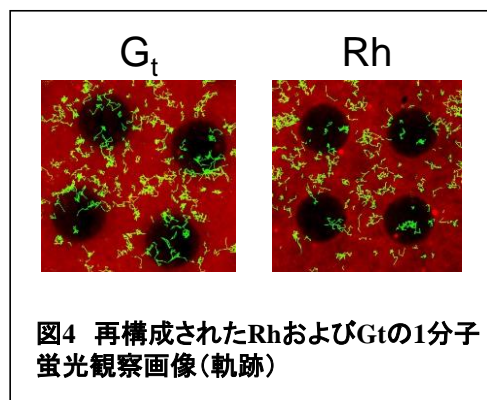


図4 再構成されたRhおよびGtの1分子蛍光観察画像(軌跡)

Rh は、蛍光色素 (Cy7) による直接標識、および Rh に対する Fab 抗体を HiLyte Fluor 750 (HL750) で標識して結合するという二種類の蛍光標識法を用いて可視化した。1 分子蛍光の軌跡を Mean square displacement (MSD) 法により解析することで各分子の拡散速度を算出し、速度分布を比較した (図 5)。いずれの蛍光標識法でも同じ速度 (中央値) ($0.28 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で分子が側方拡散していることが示された。また、膜の脂質組成 (DOPC もしくは DOPC/ DPPC/ Chol) によって拡散速度は大きく変化した。これらの実験結果より、Rh が脂質二分子膜を貫通する形で再構成され、膜内を自由に側方拡散していることが示された。再構成された Rh が本来の光受容機能を保持していることは、Rh と Gt を同時に再構成して、光照射に伴う Rh と Gt との結合 (Gt 拡散速度の低下)、および GTP 添加に伴う Gt の Rh からの脱離 (Gt 拡散速度の大幅な上昇) を観察することから示された。一般に基板表面に吸着した脂質膜に膜貫通型タンパク質を組み込むことは難しいとされる。従って、本研究で GPCR の一種である Rh を、側方拡散、機能を保持してパターン化脂質膜に組み込んだことは極めて重要な成果であると言える。

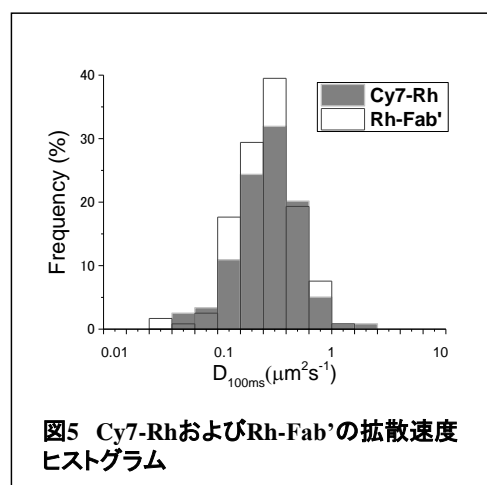


図5 Cy7-RhおよびRh-Fab'の拡散速度ヒストグラム

Rh と Gt のラフト親和性は、両分子の流動性脂質膜 (ラフト膜領域 : Lo 相) と部分重合膜 (非ラフト膜領域 : Ld 相) における存在確率を多数の分子の軌跡解析から算出することで定量化した。図 6 に TR-PE, Rh, Gt の非ラフト膜領域/ラフト膜領域分布比 (P_1) を示す。この数値が高いほど、非ラフト領域への親和性が高い。Rh、Gt は、TR-PE と同様に非ラフト膜領域 (Ld 相) への強い局在性を示した。これは、従来の生化学的手法による分離結果

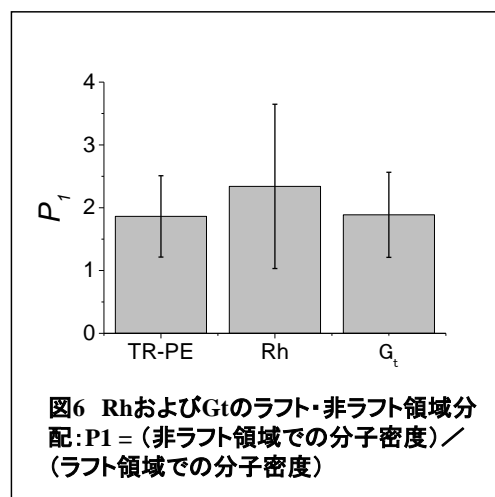


図6 RhおよびGtのラフト・非ラフト領域分配: $P_1 = (\text{非ラフト領域での分子密度}) / (\text{ラフト領域での分子密度})$

と一致している(5)。

以上の結果から、本研究においては、Rh と Gt をパターン化脂質膜に再構成し、ラフト親和性を定量する技術を確立できたと言える。残された課題は、Rh の多量体(ダイマー、オリゴマー) や Rh-Gt 複合体のパターン化脂質膜における形成、それらのラフト親和性定量である。そのためには、多量体や複合体が形成されるために十分な高濃度の Rh、Gt 分子を膜に再構成する必要がある。現在は高濃度な Rh を拡散性、機能を保持したまま再構成する手法を開発中である。この技術が確立すれば、Rh 光シグナル伝達の制御に対する脂質ラフトの役割について、これまでにない詳細かつ定量的な情報を得ることが出来るものと期待される。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、代表的な GPCR であるロドプシンを用いて、ラフト親和性を定量する技術を開発した。GPCR を介したシグナル伝達は、視覚、味覚、臭覚など幅広い感覚を担っているほか、体内における調節(ホルモンの作用)、脳神経、免疫など体内のありとあらゆる機能において中心的な役割を果たしている。従って、GPCR は、医薬品の標的分子として最も重要なものとされる。GPCR によるシグナル伝達は、シグナル増幅と抑制のバランスを精密に制御する必要がある。そのような制御に脂質ラフトが関わっていると推測されるが、その制御機構は未知である。本実験で開発されたロドプシンと脂質ラフトとの親和性定量技術は、今後、光受容シグナル伝達における脂質ラフトの役割について重要な知見をもたらすものと期待される。また、他の GPCR にも応用することで多くの GPCR のラフト親和性を定量的に評価できるようになれば、脂質ラフトによる GPCR 機能調節のメカニズムが明らかになり、医薬品分子による GPCR の機能調節機構の研究を飛躍的に発展させるものと考えられる。その結果、高い薬効と低い副作用を実現する新薬の開発を加速して、社会における健康・長寿の促進に役立つものと期待される。

5 参考文献

1. Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46-50.
2. Morigaki, K., T. Baumgart, A. Offenhäusser, and W. Knoll. 2001. Patterning solid-supported lipid bilayer membranes by lithographic polymerization of a diacytlyene lipid. *Angew. Chem., Int. Ed.* 40:172-174.
3. Okazaki, T., Y. Tatsu, and K. Morigaki. 2010. Phase separation of lipid microdomains controlled by polymerized lipid bilayer matrices. *Langmuir* 26:4126-4129.
4. Okazaki, T., T. Inaba, Y. Tatsu, R. Tero, T. Urisu, and K. Morigaki. 2009. Polymerized lipid bilayers on solid substrate: Morphologies and obstruction of lateral diffusion. *Langmuir* 25:345-351.
5. Seno, K., M. Kishimoto, M. Abe, Y. Higuchi, M. Mieda, Y. Owada, W. Yoshiyama, H. Liu, and F. Hayashi. 2001. Light- and guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate-sensitive Localization of a G Protein and its effector on detergent-resistant membrane rafts in rod photoreceptor outer segments. *J. Biol. Chem.* 276:20813-20816.