

# 脂質特異的タンパク質の網羅的解析法の開発

## Development of comprehensive analytical method for lipid-specific proteins

(日本分析化学会推薦)

代表研究者 九州大学 松森 信明 Kyushu University Nobuaki MATSUMORI  
研究協力者 仏国立研究科学センター 小林 俊秀 CNRS Toshihide KOBAYASHI

To develop a method for comprehensive analysis of lipid-binding proteins, lipid-immobilized beads were prepared using five species of sphingolipids; sphingomyelin (SM), ceramide, their hydrogenated analogs, and sphingosine. Immobilized sphingosine was expected to behave as a short-chain ceramide, which is known as an apoptosis inducer. The quantification of the amount of immobilized lipid suggests that the lipid molecules on the beads surface were dense enough to form a lipid membrane. Pull-down experiments using lysenin that is a protein specifically bound to SM showed that the protein was selectively detected only from the SM-beads, demonstrating the validity of this method. Comparison with the conventional liposome-binding assay further proved that the lipid-immobilized beads allow more efficient and selective recovery of lysenin. Then the lipid-immobilized beads were applied to brain and cell lysates to identify lipid-binding proteins by proteomics analysis. The results showed that some proteins including membrane proteins were identified as sphingolipid binding proteins. Among them, tumor protein D54 (TPD54) was further analyzed for interaction with SM, suggesting that TPD54 is a candidate of SM-binding protein.

### 研究目的

生体膜には数万種類に及ぶ脂質が存在するが、脂質二重膜を形成するためにはこれほど多種類の脂質は必要ない。つまり「脂質多様性」がなぜ存在するのか、その生物学的意義は未だ解明されていない。一方、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法によって膜タンパク質の構造が高分解能で取得できるようになり、膜タンパク質と脂質分子の複合体構造が近年多数報告されている。さらに、特定の脂質が相互作用することで膜タンパク質の構造や活性を変化させることが明らかとなった。このことから、多様なタンパク質の機能調節のために脂質多様性が生じた、との仮説が成り立つであろう。しかし、これまで脂質-膜タンパク質間相互作用は、特定の膜タンパク質の機能や構造を調べる過程で明らかとなったケースが多く、これを系統的かつ網羅的に解析する手法が欠如していた。このため当該分野の研究はまだ端緒についたばかりである。そこで我々は脂質多様性

の意義を膜タンパク質との相互作用による機能調節と仮定し、この仮説検証の一環として脂質と膜タンパク質の相互作用を解析する実用的手法の開発に着手した。

すでに我々は膜タンパク質に特異的に結合する脂質を解析する手法を開発した (Fig. 1)<sup>2)</sup>。この手法を用いて、膜タンパク質バクテリオロドプシンに特異的に結合する内因性脂質 S-TGA-1 を見出し、さらにこの脂質がバクテリオロドプシンの三量体形成やプロトンポンプ活性を促進することを明らかにした (Fig. 1)<sup>3)</sup>。本研究では、上記手法との相補性を鑑み、脂質に特異的な膜タンパク質を解析する手法の開発を目指した。すなわち、脂質を固定化したビーズを用いて、脂質分子に結合する膜タンパク質を系統的かつ網羅的にプロテオーム解析する方法論の開発と実践を行う (Fig. 2)。これにより、脂質特異的膜タンパク質を効率的に取得し、脂質-膜タンパク質相互作用が膜タンパク質の機能に与える影響を精査

する。さらに多種類の脂質を固定化させるとともに、定量プロテオミクスによる脂質特異的膜タンパク質の網羅的解析手法の確立を目標とする。

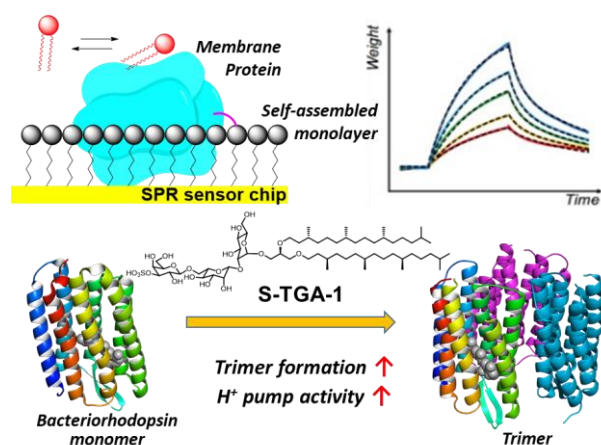


Figure 1. Analytical method for detecting membrane protein-specific lipids using surface plasmon resonance (top). To mimic the membrane environment, the sensor chip surface was coated with self-assembled monolayers, on which a membrane protein was covalently immobilized. An endogenous lipid S-TGA-1 was found as the specific lipid for a membrane protein bacteriorhodopsin (bottom).

## 研究経過

### 脂質固定ビーズの調製

脂質固定化ビーズを作製するにあたり、脂質分子の親水性頭部をビーズ表面に露出させ十分量の脂質分子を固定化することを目指した (Fig. 2)。これにより、単に脂質分子を固定化したアフィニティビーズとしてではなく、表面に脂質膜を再現し生体環境に近い状態でのスクリーニングが可能となる。まずアシル鎖末端にアミノ基を導入した脂質誘導体を合成した。このアミノ化脂質を、ビーズ表面の活性化エステルに作用させ固定した (Fig. 2)。脂質の固定化量は、遊離した NHS を HPLC によって定量した。その結果、ビーズ表面に脂質膜を再現するために十分な量の脂質分子が固定化されていることを確認した。

固定化する脂質としては生体膜中の脂質ラフトの主要成分であるスフィンゴ脂質を選択した。脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ膜領域であり、膜タンパク質が集積し膜機能のプラットフォームとしての役割を果たしていることが示唆されている<sup>4)</sup>。脂質ラフトに集積するタンパク質はラフトの硬さばかりでなく、構成する脂質分子も認識していると考えられ、代表的なスフィンゴ脂質で

あるセラミド (Cer) やスフィンゴミエリン (SM) を固定化した (Fig. 2)。これらに加え、二重結合が還元されたジヒドロセラミド (DHCer) とジヒドロスフィンゴミエリン (DHSM) についても固定化を行った (Fig. 2)。これらのジヒドロ体は、SM や Cer と比較して高いドメイン形成能をもつことが示唆され<sup>5)</sup>、生体膜中において SM や Cer とは異なった機能をもつことが考えられる。また、スフィンゴシンを固定化することで高いアポトーシス活性をもつ短鎖のセラミド<sup>6)</sup>を模した SCCer ビーズを調製した (Fig. 2)。これらビーズにより脂質ラフトに集積する膜タンパク質に加え、二重結合の有無を認識するタンパク質やアポトーシス関連のタンパク質が同定されることが期待される。

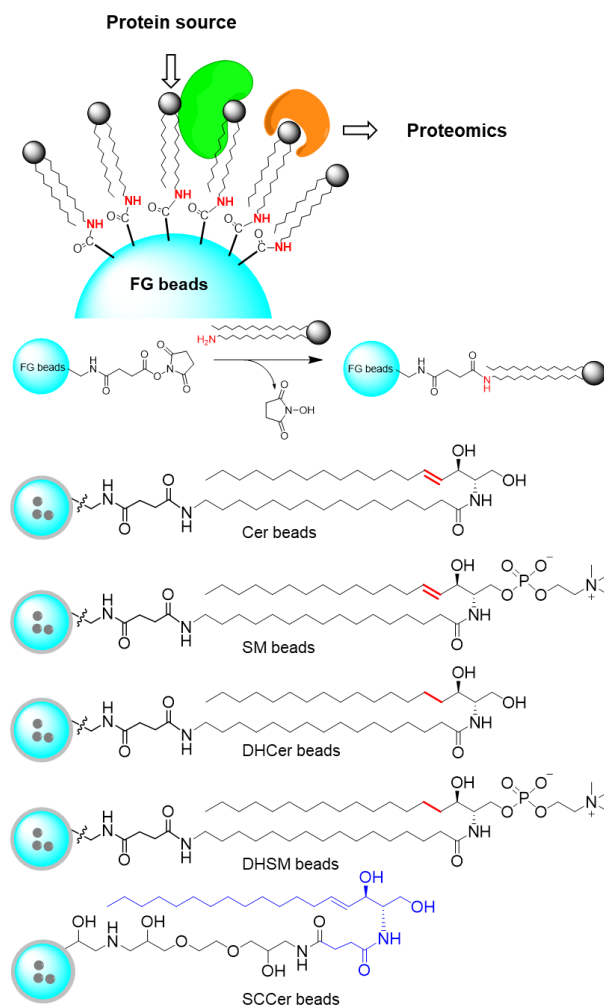


Figure 2. Schematic representation of this study. Lipid-binding proteins are obtained by the pull-down experiment using lipid-immobilized beads (top). Preparation of lipid immobilized beads and their structures (bottom).

### 脂質固定ビーズの性能評価

次に、上で調製した脂質固定化ビーズの性能を評価した。まず脂質固定化ビーズが脂質特異的結合タンパク質の探索に利用可能であることを、SM 特異的に結合するタンパク質であるライセニンを用いて確認した。ライセニンはシマミズ体腔液由来の毒素タンパク質であり、膜中の SM を認識し結合することから、ライセニンは脂質ラフトの認識プローブとして広く用いられている。実際にライセニンが SM および DHSM ビーズを特異的に認識、結合していることを確認した。

次に、脂質特異的結合タンパク質を取得する方法の一つであるリポソーム共沈法との比較を行った。リポソーム共沈法は、タンパク質とリポソームを混合した後、遠心分離によってリポソームを沈殿させることで脂質特異的結合タンパク質を取得する手法である。この手法は SM とコレステロールの複合ドメインを認識するタンパク質ナカノリを同定するなど<sup>8)</sup>、脂質とタンパク質の相互作用を検出するために汎用されてきた<sup>9)</sup>。脂質固定化ビーズはリポソーム共沈法と比較して界面活性剤存在下でも使用できるという利点があるが、さらにライセニンの回収効率および選択性についても本手法の優位性を確認した。

### タンパク質溶液のスクリーニング

次に脂質固定化ビーズを用いてタンパク質溶液のスクリーニングを行い、脂質特異的結合タンパク質の探索を実施した。タンパク質ソースとしては、マウス脳由来タンパク質可溶化画分およびマウス神経芽腫細胞 (Neuro-2a) のライセートを用いた。これらのタンパク質溶液は界面活性剤によって可溶化したものであるが、脂質固定化ビーズは界面活性剤存在下でも使用できるため、膜タンパク質を含んだ脂質特異的に結合するタンパク質の取得が可能である。

各ビーズから取得したタンパク質を電気泳動で分離し、確認された特異的なバンドを切り出し、ここに含まれる特異的結合タンパク質を同定した (Fig. 3)。また疎水性相互作用による非特異的吸着タンパク質を除くため、C12 炭素鎖で表面が覆われた Alkyl ビーズを準備し、共通で観測されたタンパク質を除外した (Fig. 3)。生体膜中に少量しか存在しない DHSM や DHCer を特異的に認識し結合するタンパク質の発見を期待したが、これらに特異的なバンドは少なかった。一方で、SM に特異的に結合するタン

パク質の中で、Tumor Protein D54 (TPD54) が特に高いプロテインスコアを示した (Fig. 3)。そこで、TPD54 について SM との相互作用解析を実施した。まずリコンビナント TPD54 を脂質固定化ビーズに作用させてプルダウン実験を行い、TPD54 が SM ビーズ特異的に結合することを確認した。次に、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を実施した。ここでは SM 脂質膜をセンサーチップ上に固定化し、TPD54 および同じファミリーに属する Tumor protein D53 (TPD53) との相互作用を観察したところ、どちらも SM に対して高い親和性があることを確認した。

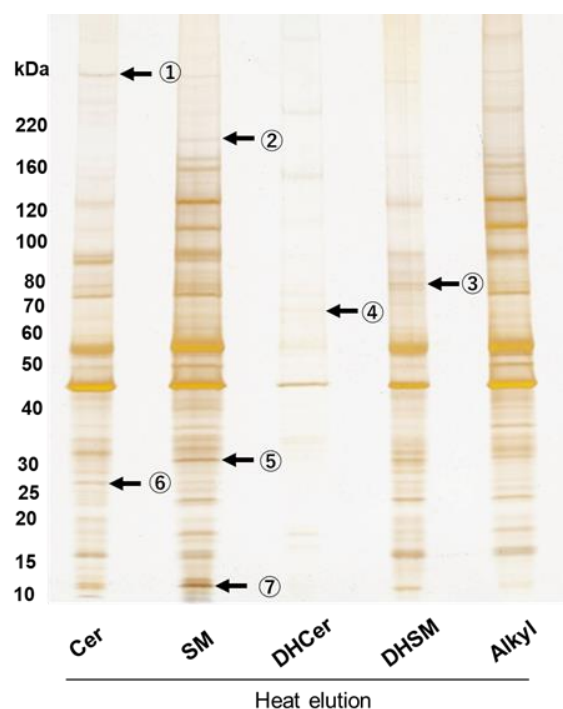


Figure 3. Electrophoresis of the proteins obtained from the pull-down experiments using lipid-immobilized beads. The protein source was Neuro-2a lysate. Band 5 was assigned as TPD54, a plausible SM-specific protein. Alkyl indicates the beads on which C12 alkyl chain was immobilized, and was used to remove proteins that nonspecifically interact with lipids via hydrophobic interaction.

### 考察

脂質ラフトには情報伝達に関与する膜タンパク質が集積し、シグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。そこで、脂質ラフトに集積するタンパク質を脂質との分子認識の観点から取得することを目的に、脂質ラフト構成脂質であ

る4種類のスフィンゴ脂質についてアシル鎖末端アミノ化脂質誘導体を合成し脂質固定化ビーズを調製した (Fig. 2)。これらビーズの固定化時に脱離する NHS の量を HPLC によって定量することで脂質分子の固定化量を算出した結果、ビーズ表面を覆うには十分な密度であることがわかった。したがって、脂質分子は極性頭部を外側に向けてビーズ表面に脂質膜を再現していると考えられる。現在電子顕微鏡などの観察を行い、実際にビーズ表面に脂質膜が形成されているか確認している。

次にこれらビーズの有用性を、SM 特異的に結合することが知られているシマミズ由来タンパク質ライセニンとの選択的結合実験によって示した。また、従来の脂質結合タンパク質の取得法の一つであるリポソーム共沈法との比較も行い、本手法の優位性を示した。このことから、脂質固定化ビーズを用いたスクリーニングによって脂質特異的結合タンパク質を選択的かつ高効率で取得できると期待される。

続いてこれらのビーズを用いてタンパク質溶液のスクリーニングを実施した。マウス脳由来タンパク質可溶性画分のスクリーニングでは、ADP/ATP translocase 1 などの膜貫通タンパク質も同定され、脂質固定化ビーズが膜タンパク質のスクリーニングにも適用可能であることが示唆された。Neuro-2a ライセートについても特異的なバンドをプロテオーム解析し (Fig. 3)、TPD54 を同定した。そこで TPD54 および同じファミリーに属する TPD53 について、別途 SM との相互作用を確認した。一方で TPD54 および TPD53 についての報告はこれまであまり多くなく、その機能の詳細は明らかになっていない。TPD54 はガン細胞に多く発現しているタンパク質の一つであり、HeLa 細胞の定量プロテオミクスの結果、同定されたタンパク質 8,804 種中 180 番目に多いことが報告されている<sup>10)</sup>。近年、直径 30 nm ほどの細胞内ナノベシクルと呼ばれる小胞による膜輸送経路の存在が明らかになり、その小胞表面に TPD54 が結合していることが報告されている<sup>11)</sup>。これらの結果より、TPD54 が生体膜中の SM ドメインを認識、結合し、小胞の出芽および膜融合に関与している可能性が示唆される。

以上、本研究では高密度で脂質を固定したビーズの開発と、それによる脂質結合タンパク質の解析を実施した。今後の課題として、一つは今回同定された TPD54 と SM との詳細な相互作用解析、およびそ

の機能的意義を明らかにする必要がある。また本手法はまだ網羅的解析が不十分である点も克服すべき課題である。この解決策として、例えば、ライセートを水溶性画分、界面活性剤可溶性画分と界面活性剤不溶性画分に分画することで、存在部位に基づきスクリーニングの対象を事前に絞った上で解析だけでなく、結合タンパク質の同定が容易になると考えられる。また、電気泳動を行うことなく網羅的に特異的結合タンパク質を同定できる定量プロテオミクスを導入することで、これまで同定できなかった微量のタンパク質についても、結合量を比較することで同定が可能となる。このように脂質特異的結合タンパク質の網羅的解析手法としての確立を目指すとともに、固定化する脂質種の拡大や、同定タンパク質と脂質の相互作用解析を行うことで、脂質とタンパク質の相互作用の理解、ひいては脂質多様性の意義の解明につなげていきたい。

## 参考文献

1. Dawaliby, R.; Trubbia, C.; Delporte, C.; Masureel, M.; Van Antwerpen, P.; Kobilka, B. K.; Govaerts, C. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 35–39.
2. Inada, M.; Kinoshita, M.; Sumino, A.; Oiki, S.; Matsumori, N. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1059*, 103–112.
3. Inada, M.; Kinoshita, M.; Matsumori, N. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 197–204.
4. Lingwood, D.; Simons, K. *Science* **2010**, *327*, 46–50.
5. Kinoshita, M.; Kyo, T.; Matsumori, N. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10.
6. Obeid, L. M.; Linardic, C. M.; Karolak, L. A.; Hannun, Y. A. *Science* **1993**, *259*, 1769–1771.
7. Sekizawa, Y.; Hagiwara, K.; Nakajima, T.; Kobayashi, H. *Biomed. Res.* **1996**, *17*, 197–203.
8. Makino, A.; Abe, M.; Ishitsuka, E. et al. *FASEB J.* **2017**, *31*, 1301–1322.
9. Loewen, C. J. R.; Gazpar, M. L.; Jesch, S. A.; Delon, C.; Ktistakis, N. T.; Henry, S. A.; Levine, T. P. *Science* **2004**, *304*, 1644–1647.
10. Hein, M. Y.; Hubner, N. C.; Poser, I.; Cox, J.; Nagaraj, N. et al. *Cell* **2015**, *163*, 712–723.
11. Larocque, G.; La-Borde, P. J.; Clarke, N. I.; Carter, N. J.; Royle, S. J. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e201812044.

## 研究の発表

口頭発表

1. 森藤将之、安田裕貴、木下祥尚、松森信明：脂質

固定化ビーズを用いたスフィンゴ脂質特異的結合タンパク質の探索、日本化学会第 101 春季年会、2021 年 3 月

2. 松森信明：脂質-膜タンパク質相互作用解析法の開発とその応用、新学術領域研究化学コミュニケーションのフロンティア第 8 回公開シンポジウム、2021 年 7 月
3. Matsumori Nobuaki: Interaction analysis between membrane proteins and lipids to understand biological membranes. The 59th Japanese Biophysical Society Meeting, November 2021.
4. Matsumori Nobuaki: Interaction analysis between

membrane proteins and lipids towards elucidation of lipid-related chemical communications. PACIFICHEM2021, December 2021.

ポスター発表

1. 森藤将之、木下祥尚、松森信明：脂質固定化ビーズを用いたスフィンゴ脂質特異的結合タンパク質の探索、第 14 回バイオ関連化学シンポジウム、2020 年 9 月
2. 森藤将之、木下祥尚、松森信明：脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の探索、分析化学会第 70 回年会、2021 年 9 月