

中性子小角散乱によるカベオリン1蛋白質複合体の構造解析

Structural analysis of caveolin-1 in lipid bilayers by small-angle neutron scattering

松尾 龍人^{1)*}, 北條 裕信²⁾, 末武 勲³⁾, 中川 洋⁴⁾

Tatsuhito MATSUO, Hironobu HOJO, Isao SUETAKE, Hiroshi NAKAGAWA

¹⁾量研, ²⁾阪大, ³⁾中村学園大, ⁴⁾原子力機構 *現在は広島国際大

(概要) エンドサイトーシスに関連するタンパク質カベオリン1(Cav-1)の、リン脂質膜中における構造情報を得るために中性子小角散乱(SANS)実験を SANS-J を用いて行った。パルミトイル化の有無の両条件において、POPA/POPS から成る単層リポソームに埋め込んだ Cav-1 溶液試料を 15% D₂O バッファー中で測定した。この重水濃度では、リポソーム由来の散乱が消え、膜に埋め込まれた Cav-1 のみの構造情報が得られる。また、リポソームの構造情報も得るために、リポソーム単体を 100% D₂O バッファー中で測定した。今回、リポソーム由来の散乱が実際に消えることを確認するとともに、リポソームの構造解析にも成功し、また Cav-1 はパルミトイル化によって分子がコンパクトになることを示唆する結果を得ることができた。

キーワード：中性子小角散乱, カベオリン, タンパク質, リン脂質, コントラストマッチング

1. 目的

カベオリン1(Cav-1)は、細胞が栄養素等を内部に取り込むエンドサイトーシスと呼ばれる現象に不可欠な蛋白質である。Cav-1 は一部が細胞膜に埋め込まれており(図1)、オリゴマー形成を持つ。また、3箇所のパルミトイル化部位(図1赤色)が存在するが、トリパルミトイル化が Cav-1 モノマーの構造、オリゴマー形成、ひいてはエンドサイトーシスに及ぼす影響は不明である。それは、Cav-1 モノマーの単離及び in vitro においてトリパルミトイル化が困難であることによる。さらに、蛋白質-膜複合体は結晶構造解析や NMR の適用が困難であることが多い。このような試料及び測定技術上の問題のため、Cav-1 における構造生物学的研究は停滞している。

これまで Cav-1 を単離することは困難であったが、最近、研究協力者の北條教授及び末武教授は、Cav-1 の全合成及びトリパルミトイル化に初めて成功した[1]。これにより、Cav-1 のモノマー状態における構造解析が現実的となった。そこで本研究では、トリパルミトイル化 Cav-1 を対象に、蛋白質-膜複合体の解析に有効な中性子小角散乱(SANS)を用いて構造解析を行う。単層リポソーム、および単層リポソームに挿入した Cav-1 全長の中性子小角散乱実験を行い、トリパルミトイル化による Cav-1 構造変化を明らかにする。

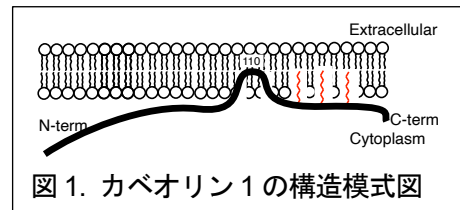


図1. カベオリン1の構造模式図

2. 方法

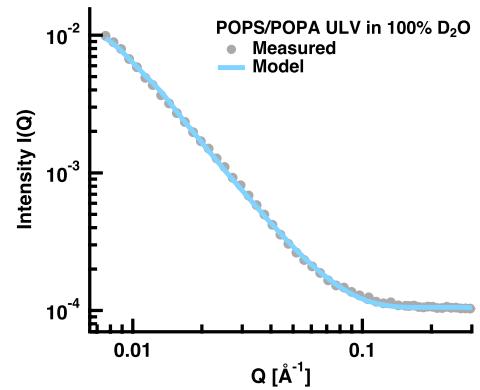
本課題では、以下の試料を調製し、SANS-JにてSANS測定を行った。温度は293 K、カメラ長は4mとした。

1. トリパルミトイル化なし Cav-1 in 15% D₂O バッファー
2. トリパルミトイル化あり Cav-1 in 15% D₂O バッファー
3. 13 mg/ml 単層リポソーム(POPA:POPS = 1:1) in 15% D₂O バッファー
4. 13 mg/ml 単層リポソーム(POPA:POPS = 1:1) in 100% D₂O バッファー
5. 15% D₂O バッファー (20 mM NaHPO₄, 100 mM NaCl, pD 7.2)
6. 100% D₂O バッファー (20 mM NaHPO₄, 100 mM NaCl, pD 7.2)

3. 結果及び考察

本課題では、実験に用いたリポソームの構造および、リポソームに埋め込まれた Cav-1 の構造情報を得ることを目的とした。

100% D₂O バッファー中で測定したリポソームの散乱曲線を、理論モデル(Schultz 分布を考慮した Core-shell 3S model)を用いて非線形フィッティングを行った。その結果を右に示す。実験散乱曲線を極めて良くフィットできるモデルを得ることができた。その結果、リポソームの半径が約 60 nm、脂質二重層の厚さが 44.9 Å であることがわかった。SANS 測定より前に DLS で測定したリポソームの半径が 50-60 nm であったことから、SANS 測定後もリポソームが安定であることがわかる。さらに、15% D₂O バッファー中で測定



した Cav-1 の散乱曲線の解析も、構造モデル計算を用いて進めている。こちらは、まだ進行中であり、確固とした結果が得られていない。また、より構造モデルを詳細に得るため、近い将来にビームタイム申請を行い、Q の大きい領域も測定したいと考えている。散乱曲線の解析から、パルミトイル化によって分子がコンパクトになるという結果が得られており、今後はこの変化がどのような構造に起因するのか、その点を理解するために構造モデル計算を行うことが重要になっている。

本報告書が原子力機構ホームページで公表されること、且つ解析結果は未発表であり原著論文として公表していないため、これ以上の詳細は記述しない。

4. 引用(参照)文献等

1. Hojo H., Takei, T., Asahina, Y., Okumura, N., Takao, T., So, M., Suetake, I., Sato, T., Kawamoto, A., Hirabayashi, Y., Ang. Chem. Int. Ed., 60:13900-13905, (2021).