The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	脂質モデル膜におけるガングリオシドGM3とEGF受容体膜貫通ペプチドの相互作用
Author(s)	中野, 幹人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82017
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　中野　幹人　　）	
論文題名	脂質モデル膜におけるガングリオシドGM3と EGF受容体膜貫通ペプチドの相互作用

論文内容の要旨

細胞接着やタンパク質認識などを媒介する役割を担うことで知られる糖脂質は，生体膜中の機能ドメインに集積してその機能を発揮する．このような機能ドメインの形成を誘起する糖脂質の側方的な分子間親和性について興味が持たれているが，理解は進んでいない．特にガングリオシドGM3(図1)は，2型糖尿病やアレルギー性喘息との関連が報告されており，シアル酸を含む糖脂質のうち最も単純な構造を有する生合成初期産物である．GM3は上皮成長因子(EGF)受容体のリン酸化を阻害し，細胞増殖シグナルの膜内への移行をコントロールすることでも知られる[1]．EGF受容体の活性化には膜貫通領域を介した二量体の形成が不可欠であることから，GM3がその過程に影響を与えていることが示唆される．また，脂質ラフトドメインとの関連も報告されており，GM3がEGF受容体のドメインへの局在に関与しているとの仮説が提唱されている[2]．

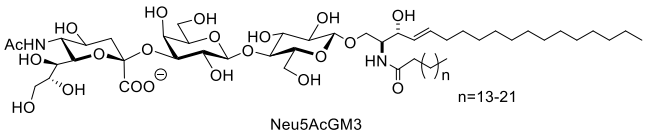

図1　ガングリオシドGM3の構造.

本研究では，脂質―膜タンパク質の相互作用の詳細な解明を目指し，GM3とEGF受容体膜貫通領域が親和性を発揮するメカニズムを均一な脂質モデル膜中で再現することを試みた．まず，①蛍光標識膜貫通ペプチドを新規合成し，均一組成の脂質モデル膜中における挙動を評価した．続いて，②ペプチドプローブとGM3の親和性の定量解析が可能となる実験系の確立を試みた．特に，一回膜貫通型の膜タンパク質の配座・配向は実験条件に左右されやすく，さらに脂質との結合寿命が非常に短いため，さまざまな要因が実験結果に影響を与える．いくつかの条件を最適化することで，サンプル調製・および測定上の諸問題を克服し，親和性の定量評価を達成した．

① 蛍光標識ペプチドの合成と脂質モデル膜中での挙動解析

EGF受容体膜貫通(TM)領域に対応する34残基の疎水性ペプチド(表1)を固相合成によって作製し，N末端を蛍光団NBD(nitrobenzoxadiazole)で標識して新規プローブ・NBD-TMを調製した．

表1　合成したペプチド（EGFR-TM）の配列．N末端をNBDで標識しNBD-TMとした．

	sequence
human EGFR (638-671)	TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRR
EGFR-TM	TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMSSS

疎水性ペプチドの精製に用いられるギ酸を含む溶出液によって，カラムへの配列特異的な吸着が促進され，目的物を高純度で精製することができた(図2).

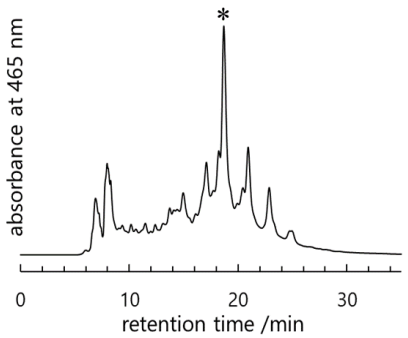

図2　NBD-TMのHPLCクロマトグラム．溶出液としてギ酸を含む条件を使用した．

脂質モデル膜サンプル中での自己消光実験によって，NBD-TMプローブが脂質二重膜に再構成され，プローブ濃度と二重膜の相状態が会合体の形成に影響を与えていることが明らかとなった(図3).

また，膜に5 mol%のGM3を含んだ場合，蛍光強度が有意に上昇し，ペプチドの会合に伴う自己消光が減少した．このことから，NBD-TMの膜へ再構成され，その会合挙動が膜中における環境に対応していることを確認した．

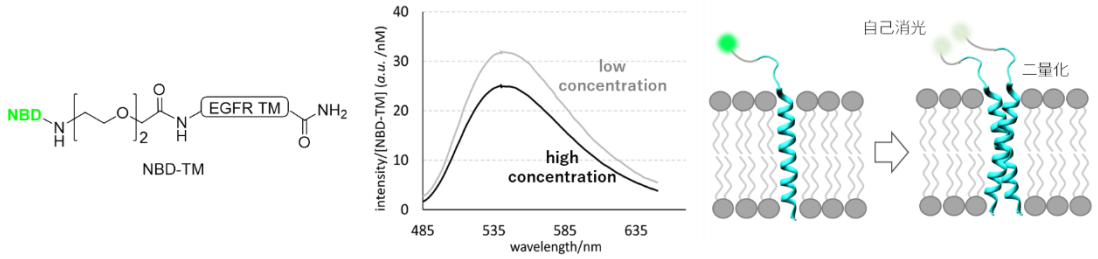

図3　脂質膜中におけるNBD-TMの濃度依存的な自己消光実験．

② GM3と膜貫通ペプチドの特異的な相互作用を検出するための方法論の開発

Förster Resonance Energy Transfer(FRET)測定をモデル膜中の蛍光分子ペアに適用する際には，膜中における蛍光分子のランダムな拡散などに起因するバックグラウンドのFRETが誤差の原因となる．この影響を最小限にとどめるために実験条件を検討した結果，DOPC(1,2-dioleoyl-glycero-phosphocholine)からなる二重膜中にNBD-TMを0.005 mol%で組み込み，蛍光標識GM3(ATTO594-GM3)を0.1 mol%加えた場合に，温度上昇に従ってFRET効率の増加が認められた(図4)．ATTO594-GM3は親水性の大きな赤色蛍光団によって標識されたプローブであり，脂質膜中で天然のGM3と同等の振る舞いを示すことが報告されている[3]．一方，ホスファチジルエタノールアミン(PE)の頭部がNBDで標識されたNBD-PEをFRET実験のコントロールとして用いた場合，温度変化の影響がみられなかった．この条件において，TMペプチドの会合による影響を抑え，TMペプチドとGM3の相互作用を特異的に観測できることを見出した．

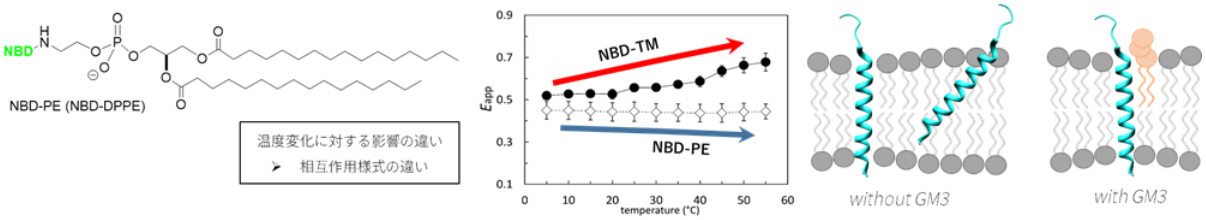

図4　NBD-TMまたはNBD-PEをドナーとし，蛍光標識GM3とのFRET／温度変化測定を行った．

得られたFRET結果から結合定数を算出し，van't Hoffプロットによって結合自由エネルギーのおおよその値を見積もった（$\Delta G \approx -10$ kJ / mol; $\Delta H \approx 20$ kJ / mol; $\Delta S \approx 100$ J / K mol)．その結果，ΔGの値は先行研究において得られたTMペプチドの二量化エネルギー($\Delta G = -10.5 \sim -11.7$ kJ/mol)とおおむね一致した[4]．このことから，GM3とTMペプチドの間に働く脂質膜中の相互作用について，NBD-PEをコントロールとして利用したFRET解析によって定量的な解析が達成されたと考える．また，ΔH，ΔSが正の値となったことから，TMペプチドとGM3の親和性は主に疎水性相互作用に起因していると推定された．膜中でペプチドが不安定となりやすい高温条件おいて特異的なFRETが増加したことは，EGF受容体膜貫通ペプチドと膜脂質が共存する条件においてGM3が膜への挿入や配向を制御していることを示唆している．

以上の結果から，EGF受容体のTM領域において，GM3が有する親水性頭部がTM・脂質膜表面における特異的な相互作用を通じてTMペプチドの配向を安定化していることが示された．

(1) Bremer, E. G.; Hakomori, S. I.; Bowen-Pope, D. F. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6818–6825.
(2) Coskun, Ü.; Grzybek, M.; Drechsel, D.; Simons, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 9044–9048.
(3) Komura, N.; Suzuki, K. G. N.; Ando, H.; Konishi, M.; Koikeda, M.; Imamura, A.; Chadda, R.; Fujiwara, T. K.; Tsuboi, H.; Sheng, R.; et al. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402–410.
(4) Chen, L. Merzlyakov, M. Cohen, T. Shai, Y. Hristova, K. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4622–4630.

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　Mikito Nakano　）	
論文題名	Interaction between Ganglioside GM3 and EGF Receptor Transmembrane Peptide in Model Lipid Bilayers.

論文内容の要旨

Glycosphingolipids (GSLs), which are known to mediate cell adhesion and protein recognition, accumulate in functional domains in biomembranes and exert their glycan functions. The lateral intermolecular affinities of GSLs that induce the formation of such functional domains are of great interest and still poorly understood. In particular, ganglioside GM3 (Fig. 1), which has been reported to be associated with type 2 diabetes and allergic asthma, is an early biosynthetic product with the simplest structure among sialic acid-containing glycolipids. GM3 is also known to inhibit phosphorylation of the epidermal growth factor (EGF) receptor and to control the translocation of signals regulating proliferation or differentiation into the cytosol[1]. Since dimer formation via the transmembrane region is essential for the activation of the EGF receptor, GM3 may affect this process. It has also been reported that GM3 is associated with lipid raft domains, suggesting a hypothesis by which GM3 controls the localization of EGF receptors to these domains[2].

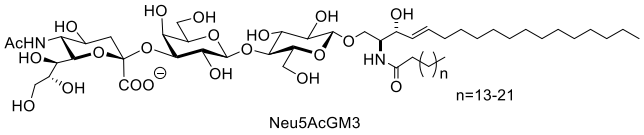

Figure 1 Structure of ganglioside GM3

In this study, to elucidate such lipid-membrane protein interactions in detail, we attempted to reproduce the mechanism of affinity between GM3 and the EGF receptor transmembrane region in a homogeneous model lipid bilayers. First, we synthesized a novel fluorescently labeled transmembrane peptide and evaluated its behavior in lipid bilayers. Then, we attempted to establish an experimental system for quantitative analysis of the affinity between the peptide probe and GM3. In particular, since conformation of single-pass transmembrane proteins are easily subjected to experimental conditions in aqueous sample and exhibit a very short binding lifetime to lipids, the results are affected by various errors. By optimizing several conditions, we overcame the problems in sample preparation and measurement, and achieved quantitative evaluation of the affinity.

i. <u>Synthesis of fluorescently labeled peptides and analysis of their behavior in model lipid bilayers</u>

A 34-residue hydrophobic peptide corresponding to the EGF receptor transmembrane (TM) region (Table 1) was elongated by solid-phase synthesis, and its N-terminus was labeled with the fluorophore NBD (nitrobenzoxadiazole) to prepare a new probe (NBD-TM).

Table 1 The sequence of EGFR-TM which was derivatized to NBD-TM.

	sequence
human EGFR (638-671)	TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRR
EGFR-TM	TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMSSS

The purification of crude TM peptide was achieved by HPLC. The use of an eluent containing formic acid promoted sequence-specific adsorption of highly hydrophobic peptide on the column and resulted in good peak separation (Fig. 2).

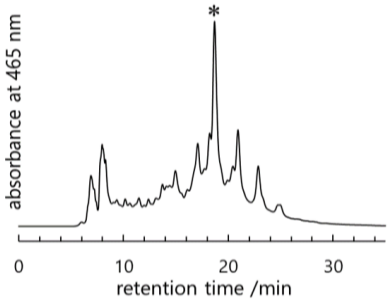

Figure 2 HPLC chromatogram; * = NBD-TM. The eluent included formic acid.

Self-quenching experiments with bilayer samples revealed that the NBD-TM probe reconstituted into lipid bilayers and controlled dimer state in response to the density of the TM peptide in the lipid bilayers (Fig. 3). When the membrane contained 5 mol% GM3, the fluorescence intensity increased significantly and the self-quenching accompanied with peptide dimerization was suppressed. This indicates that NBD-TM was reconstituted into membranes and that the dimerization behavior corresponded to the environment in the membrane.

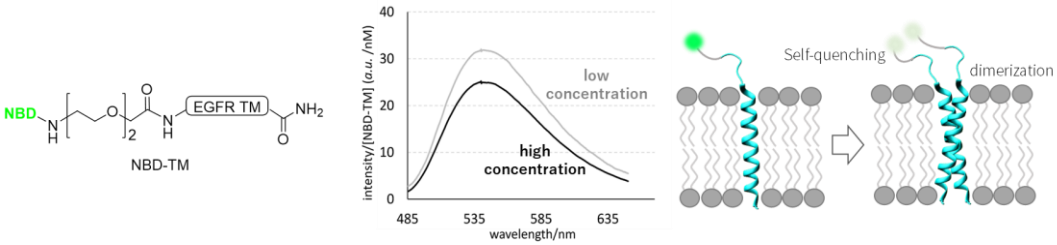

Figure 3 Concentration-dependent self-quenching of NBD-TM in lipid bilayers.

ii. <u>Investigation of lipid bilayer conditions for the specific interaction between GM3 and the transmembrane peptides.</u>

As a result of examining the concentration conditions for Förster Resonance Energy Transfer (FRET) measurements, NBD-TM was incorporated at 0.005 mol% in a lipid bilayers consisting of DOPC (1,2-dioleoyl-glycerophosphocholine) with fluorescently labeled GM3 (ATTO594-GM3). It has been reported that ATTO594-GM3 is a probe labeled with a large hydrophilic fluorescent group and behaves similarly to natural GM3 in membrane bilayers[3]. Under these conditions, NBD-TM represented explicit increase of FRET efficiency in response to temperature increase. On the other hand, NBD-PE, in which the head-group of phosphatidylethanolamine (PE) is labeled with NBD, was used as a control in FRET experiments. It showed no effect with temperature change (Fig. 4). Thus, we found that the interaction between TM peptide and GM3 could be specifically observed with minimal error-causing effects such as TM peptide aggregation and background FRET due to random diffusion of FRET pairs in the membrane.

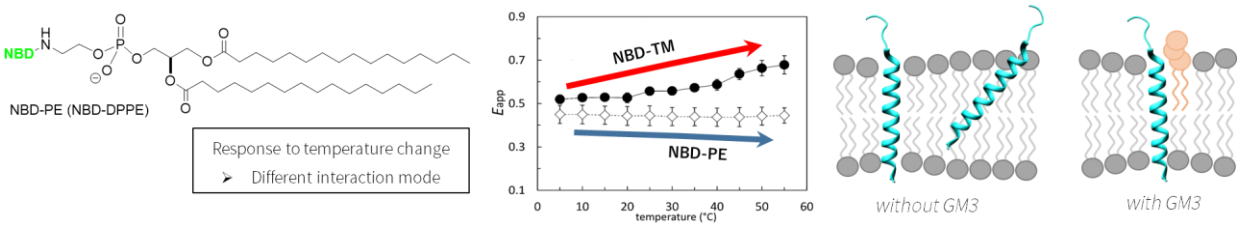

Figure 4 Results of FRET/temperature change measurements using NBD-TM or NBD-PE as donors.

The association constants were calculated from the FRET efficiency, and the values of binding free energies were obtained by van't Hoff plot ($\Delta G \approx -10$ kJ / mol; $\Delta H \approx 20$ kJ / mol; $\Delta S \approx 100$ J / K mol). The result of ΔG was corresponded with the energy landscape of the TM-TM association ($\Delta G = -10.5 \sim -11.7$ kJ/mol)[4]. This supports the fact that quantitative analysis of the interaction between GM3 and TM peptide in lipid membranes was achieved by FRET analysis using NBD-PE as a control. Based on the positive ΔH and ΔS features, the binding mode of TM peptide to GM3 was inferred to be a hydrophobic interaction. This indicates that the insertion and orientation of the EGF receptor transmembrane peptide are controlled in the presence of GM3. This is consistent with the observation of specific FRET under high temperature conditions, when the peptide is likely to be unstable in the membrane.

These results indicate that the hydrophilic head-group of GM3 stabilizes the orientation of the TM peptide of the EGF receptor through a specific interaction around the surface of the membrane bilayers.

(1) Bremer, E. G.; Hakomori, S. I.; Bowen-Pope, D. F. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6818–6825.
(2) Coskun, Ü.; Grzybek, M.; Drechsel, D.; Simons, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 9044–9048.
(3) Komura, N.; Suzuki, K. G. N.; Ando, H.; Konishi, M.; Koikeda, M.; Imamura, A.; Chadda, R.; Fujiwara, T. K.; Tsuboi, H.; Sheng, R.; et al. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402–410.
(4) Chen, L. Merzlyakov, M. Cohen, T. Shai, Y. Hristova, K. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4622–4630.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（中野幹人）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	村田　道雄
	副 査　教 授	菊地　和也 （工学研究科）
	副 査　教 授	鈴木　孝禎
	副 査　准教授	花島　慎弥

生体膜中での上皮成長因子受容体(EGFR)と糖脂質ガングリオシド GM3 の生体膜中における相互作用の理解を目指して、中野氏はリン脂質二重膜中を用いて EGFR 膜貫通領域ペプチドと GM3 との直接結合を蛍光分光法によって検出しようとした。

細胞接着やタンパク質認識などを媒介する役割を担う糖脂質は、生体膜中のドメインに集積してその機能を発揮する。このような機能ドメインの形成を誘起する糖脂質の側方的な分子間親和性については興味が持たれているが、理解は進んでいない。ガングリオシド GM3 は、シアル酸を含む糖脂質の生合成初期産物である。GM3 は EGF R のリン酸化を阻害し、細胞増殖シグナルの膜内への移行をコントロールすることが知られている。EGF 受容体の活性化には膜貫通領域を介した二量体の形成が不可欠であることから、GM3 がその過程に影響を与えていることが示唆される。また、脂質ラフトドメインとの関連も報告されており、GM3 が EGF 受容体のドメインへの局在に関与しているとの仮説が提唱されている。

中野氏は、脂質―膜タンパク質の相互作用の詳細な解明を目指し、GM3 と EGFR の膜貫通ペプチドが親和性を発揮するメカニズムを均一な脂質モデル膜中で再現することを試みた。まず、蛍光標識膜貫通ペプチドを新規合成し，均一組成の脂質モデル膜中における挙動を評価した。続いて、このペプチドと GM3 の親和性の定量解析が可能となる実験系を確立した。特に、一回膜貫通型タンパク質の配座・配向は実験条件に左右されやすく、さらに脂質との結合寿命が非常に短いため、さまざまな要因が実験結果に影響を与えるが、中野氏はサンプル調製および測定上の諸問題を克服し、親和性の定量評価を達成した。具体的には、蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)による膜貫通ペプチドと脂質の相互作用を解析することで、両者の相互作用メカニズムの一端を明らかにした。また、蛍光標識ペプチドを用いた自己消光実験により、膜の流動性を含めてこのペプチドの多量化を制御する要因を見出した。これら業績は、FRET や自己消光実験の濃度変化、温度変化実験など困難な実験上の障害を解決して、分子間相互作用を定量解析した点で高く評価できる。

以上の研究業績によって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。