

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14688

研究課題名(和文)新規脂質を利用した膜タンパク質の結晶構造解析

研究課題名(英文)Membrane protein crystallography using new lipid

研究代表者

伊原 健太郎 (Ihara, Kentaro)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：90647207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂質メソ相は膜タンパク質の結晶化に有用であるが、利用できるマトリクス脂質はモノアシルグリセロール(MAG)に限られてきた。そんな中、我々は安定な脂質メソ相を形成するイソプレノイド鎖型脂質(IPCL)を見出した。IPCLは特徴的な飽和分岐アルキルを持ち、MAGと比べより低温でも脂質メソ相が安定である。IPCLの有用性を示すため、GPCRの一つアデノシンA2A受容体の結晶化を行ったところ良質な結晶が得られ、クライオ温度、4°C、20°Cの三つの異なる測定温度で構造解析に成功した。これにより、IPCLはヒト由来膜タンパク質の結晶化に有用であり、幅広い温度範囲で結晶構造解析を実現できる事が判明した。

研究成果の概要(英文)：Integral membrane proteins are crystallized in lipidic mesophase, mostly using monoacylglycerol (MAG) as crystallization matrix. However, almost no choice other than MAG is available so far. In such situation, we have shown that isoprenoid-chained lipid (IPCL) can be applicable to membrane protein crystallography. Structurally, IPCL has unique saturated alkyl chain with methyl branches realizing stable lipidic mesophase at non-freezing low temperature compared to MAG. Our project aims to show that IPCL can be a crystallization matrix for membrane protein in wide temperature range. As a representative of G protein coupled receptor (GPCR), adenosine A2A receptor was crystallized using IPCL, and crystal structures could be determined at cryogenic temperature and two non-freezing temperatures, 4 and 20°C. Our results suggest that IPCL is useful for human membrane protein crystallization, and expands experimental temperature range.

研究分野：タンパク質の結晶構造解析

キーワード：膜タンパク質 脂質メソフェーズ結晶化 イソプレノイド鎖型脂質 Gタンパク質共役型受容体 アデノシンA2A受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜タンパク質のLCP結晶化

膜タンパク質は、界面活性剤で可溶化された状態で結晶化する方法と、人工的に作成した脂質二重膜に再構成して結晶化する二通りの方法がある。前者は可溶性タンパク質と同様の手順で結晶化できる簡便さがあるが、膜貫通部位が界面活性剤に覆われるため結晶パッキングが膜タンパク質の親水性部位に限られ、良好な回折を与える結晶が得られにくい。一方、後者では膜貫通部位間の結晶パッキングが利用でき、比較的高分解能の回折を与える結晶が得られる。

脂質二重膜の膜曲率の変化で幾つかの脂質相をとることができる。このうち、三次元的に脂質二重膜が連続した脂質キュービック相(LCP)とスポンジ相を合わせた、脂質メソ相を利用した結晶化を、脂質メソフェーズ(あるいはLCP)結晶化と呼ぶ。

(2) LCP結晶化に利用出来る新規脂質

LCP結晶化に利用できるマトリクス脂質は、膜タンパク質を活性ある状態で保持し、安定なLCPを形成せねばならない制約から、歴史的にモノオレイン(MO)に代表される少数のモノアシルグリセロール(MAG)に限られてきた。そんな中、羽藤らは安定なLCPを形成する一群のイソプレノイド鎖型脂質(IPCL)を見出した(文献,)。

MAGとIPCLは疎水・親水部位共に構造が異なり、特にMAGの疎水部位は不飽和直鎖アルキルであるのに対し、IPCLは飽和分岐アルキルという、構造の大きな違いがある(図1)。物性も異なり、例えばMOは17°C以下でメソ相から結晶性ラメラ相に相転移するが(文献), IPCLはLCPが安定であり、低温での結晶化や回折データ測定を可能にすることが期待される(文献,)。

1-O-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)-β-D-xyloside (β-XylOC₁₆₊₄)を用いたバクテリオドプシンの結晶構造解析がまず行われ、IPCLがバクテリア由来の膜タンパク質の結晶化に利用できることが判明した(文献)。

本研究ではIPCL活用を一般化するため、1-O-(5,9,13,17-tetramethyloctadecanoyl)-erythritol (EROCOC₁₇₊₄)を用いて、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の結晶構造解析、及びEROCOC₁₇₊₄の物性解析を行った。

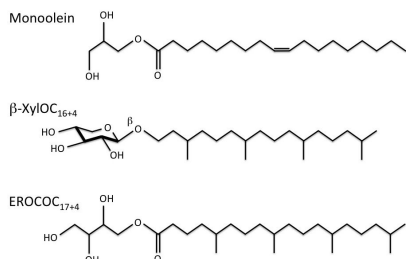


図1. MO, β-XylOC₁₆₊₄, EROCOC₁₇₊₄の構造。MOとEROCOC₁₇₊₄はエステル型脂質、β-XylOC₁₆₊₄はエーテル型脂質。

2. 研究の目的

LCP結晶化は膜タンパク質の構造解析に必須の手法となったが、利用出来る脂質マトリクスが現状ではほぼMAGしかない。様々な膜タンパク質の結晶化に対応するため、MAGにはない物性を有する脂質の選択肢を得ることは有意義である。

新しく見出されたIPCLは飽和アルキルのためにMAGと比較して化学的に安定であり、低温でもLCPが安定であるため、LCP結晶化への適用が期待される。IPCLは少なくともバクテリア由来の膜タンパク質の結晶構造解析に適用できることが明らかにされたが、医学的に重要なヒト由来の膜タンパク質への適用例はない。また、低温での結晶構造解析が有用である報告もない。

本研究ではEROCOC₁₇₊₄を用い、GPCRの一つアデノシンA_{2A}受容体(A_{2A}R)の結晶化を検討する。そして、シンクロトロン放射光を用いたクライオ温度(約-180°C)での構造解析、及びX線自由電子レーザーを用いた4°Cと20°Cでのシリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)を試みる。

さらに、EROCOC₁₇₊₄を用いた結晶化に必要な”EROCOC₁₇₊₄/水”系の脂質濃度-温度依存の相図を作成、さらに、結晶化に多用される0~20°Cの温度範囲におけるLCPの安定性(平衡相か不安定相か?)を検討する。

以上を以ってIPCLの特性と運用方法を提示することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) EROCOC₁₇₊₄を用いたA_{2A}Rの結晶化

β-XylOC₁₆₊₄と比較してMOに構造が近く、さらに低温でLCPが安定なEROCOC₁₇₊₄を脂質マトリクスとして用いた。医学的に重要なヒト由来膜タンパク質の代表としてA_{2A}Rを選んだ。A_{2A}RはMOを用いて高精度の結晶構造解析が報告されており(文献)、多数のMO分子やGPCRの構造維持と活性に関わるとされるコレステロール(CHO)分子が観測されているので、脂質マトリクスの評価に最適であると判断した。結晶化においては、EROCOC₁₇₊₄とCHOを重量比で1:9で混合した脂質6に対し、60 mg/mL A_{2A}Rを4加え、ガスタイトシリンジで混合した。得られたLCPサンプル40 nLに結晶化溶液1 μL添加し、ガラスサンドイッチ法で結晶化した。結晶化は4, 11, 15, 20, 25, 30°Cで行った。

(2) EROCOC₁₇₊₄-A_{2A}Rの結晶構造解析

クライオ温度での測定は、SPring-8 BL32XUにおいてKUMA及びZOOシステムを用い、液体窒素凍結した複数の結晶から回折データを収集した。データ処理はKAMOを用いた。4°C、20°Cの測定はSACLA BL3でSFX測定を行った。データは中根パイプラインで処理した。なお、SFX測定用の結晶

は、ガラスサンドイッチ法で最適化された結晶化条件をもとにシリンジ内において $10^7/\text{mL}$ 以上の結晶密度で $50 \mu\text{L}$ 作成、半分ずつをそれぞれの温度での測定に利用した。

(3) ”EROCOC₁₇₊₄/水”系の相挙動

-20°C ~ 60°C の温度範囲、脂質濃度範囲 50wt% ~ 100% に於ける ”EROCOC₁₇₊₄/水”系の相挙動を、偏光顕微鏡 (Olympus BX51)、X線小(広)角散乱(SAXS, WAXS) (Rigaku Nano-Viewer) による相構造解析、ならびに DSC (Seiko SSC/560U) による熱挙動解析により研究した。実験方法は文献 に準じた。しかし、キュービク液晶の顕著な過冷却現象を考慮すれば、文献 の方法のみで真の平衡相を確定出来ない。本研究では、0~20°C の温度(具体的には、 $T^* = 1, 10, 20^\circ\text{C}$ の3温度)で2ヶ月~1年に渡る所定温度(T^*)保存条件での相構造の時間変化を追跡すると共に、 T^* より高温($T_H = +25^\circ\text{C}$) から、並びに低温($T_L = -20^\circ\text{C}$) からの二つの異なったルートで T^* に到達させた場合に得られる T^* に於ける相構造の差異を調べ、真の平衡相構造を決めた。

4. 研究成果

(1) EROCO₁₇₊₄ を用いた A₂A_R の結晶化

MO を用いた A₂A_R の結晶化条件は、25-28% PEG400, 40-60 mM NaSCN, 2% 2,5-hexanediol, 100 mM sodium citrate pH 5.0 と報告されている(文献)。EROCOC₁₇₊₄ を用いた結晶化のスクリーニングも最初は MO と同じく 20°C で行い、36-38% PEG300 or PEG400, 50 mM NaSCN, 2% 2,5-hexanediol, 100 mM Na Citrate pH 5.5-6.0 において良質の結晶が得られることが判明した。結晶は MO を用いたもの (~50 μm) より小さいが、再現よく 10~20 μm のサイズの結晶が得られた(図 2)。

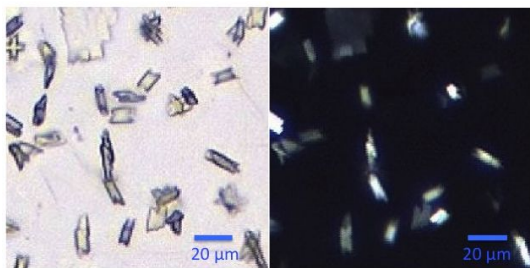


図 2. EROCO₁₇₊₄-A₂A_R の結晶。左は通常撮影、右は偏光板を入れて複屈折を観察。結晶のサイズは 10~20 μm 。

面白いことに、EROCOC₁₇₊₄ を用いた A₂A_R の結晶化では、PEG 濃度を上げることにより結晶サイズを大きく、結晶密度を低くでき、逆に PEG 濃度を下げると結晶サイズを小さく、結晶密度を高くできることが分かった。この性質を利用し、SFX 測定用の結晶を希望

の濃度である $10^7/\text{mL}$ の結晶密度で作成することに成功した。SFX 測定用の結晶のサイズは、密度を高める必要があったので、5~10 μm となった。

温度を変えた結晶化では相分離は生じず、15, 20, 25°C でほぼ同じサイズとクオリティの結晶が得られたが、11°C では明らかに結晶サイズが小さくなり、4°C ではさらにサイズが低下した。そのため、構造解析に使用する結晶は 20°C で作成することにした。30°C では結晶は得られなかった。

膜タンパク質の種類や熱安定性、結晶サイズによっては、低温での結晶化が望ましいケースもある。EROCOC₁₇₊₄ はそのような膜タンパク質の LCP 結晶化にも有用であるかもしれない。

また、20°C での結晶化後に 4°C で保存しても、さらにその後 20°C に戻しても結晶が少なくとも数週間劣化しないことも回折能により確認した。この性質は、結晶の保管や運搬時に温度管理にさほど神経を使わなくてもよい可能性を示唆し、後述の 4°C で測定した SFX の結果もそれを指示する。

(2) EROCO₁₇₊₄-A₂A_R の結晶構造解析

クライオ温度では 2.0 分解能 ($R_{\text{work}} / R_{\text{free}} = 18.1 / 22.3\%$)、4°C SFX は 1.8 分解能 ($R_{\text{work}} / R_{\text{free}} = 17.7 / 21.3\%$)、20°C SFX は 1.8 分解能 ($R_{\text{work}} / R_{\text{free}} = 18.0 / 21.5\%$) で構造決定できた。結晶の空間群は C222₁、格子定数は $a = 40, b = 179, c = 142$ 程度と、MO を用いた 1.8 分解能の結晶構造 (PDBID 4EIY, 文献) と変わらず、タンパク質部位の構造は本質的に等価である一方、タンパク質を取り巻く脂質の電子密度は脂質構造の違いを反映して MO から僅かにずれていることが判明した。図 3 の箇所では、EROCOC₁₇₊₄ 分子全体が明瞭に観察され、MO との構造の違いが比較できた。

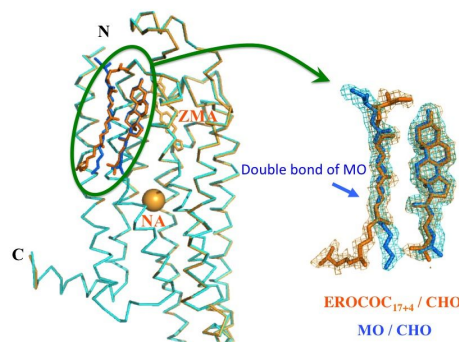


図 3. EROCO₁₇₊₄-A₂A_R と MO-A₂A_R の結晶構造。左はタンパク質主鎖がほぼ一致し (bRIL は非表示)、明瞭に見えている EROCO₁₇₊₄ または MO が若干ずれていることを示す。これらの近傍に保存されるコレステロールのずれは少ない。ZMA はインパースアゴニストの ZM241385、NA はナトリウムイオン。右は当該脂質の $2F_o - F_c$ 電子密度図を 1σ で表示。EROCOC₁₇₊₄ の疎水部位は MO の二重結合に相当する部位で曲がっており、上方の親水部位にもずれが見られる。

EROCOC₁₇₊₄-A₂AR は、クライオ温度、4°C、20°C で構造の違いがほとんどなく、温度因子が極めて大きく見えにくい脂質部位の電子密度もほぼ一致する。ごく僅かな違いではあるが、温度が低くなるほど格子が小さくなり、温度因子が下がり、見える水の数が増える、という理屈通りの傾向も見られ、解析の精度と一貫性を裏付けている。

今まで MAG だけでは実現し得なかった測定が、4°C での SFX 測定である。MO では結晶性ラメラ相の析出により、回折データが著しく劣化する。EROCOC₁₇₊₄ の場合、相分離を示す兆候は 4°C でも一切現れず、クライオ温度及び 20°C と同等以上のデータが得られている。同じ SFX 測定を行った 20°C のデータと比較すると、完全に同じ結晶密度のサンプルを使用したにもかかわらず、4°C の方が結晶のヒットレートが倍近く高くなるという驚きの差が見られた。低温で脂質が適度に硬化し、サンプルが安定に流れるようになったことが原因であると推測される。SFX 測定では安定したサンプル供給が肝要であり、各種添加剤を用いたサンプル粘性や硬度の調整が一般的だが、幅広い温度域で LCP が安定な EROCO₁₇₊₄ を用いれば、温度でこれらをコントロールできる可能性が示された。

以上の結果は投稿準備中である (Ihara K, Hato M *et al.*, Isoprenoid-Chained Lipid as matrix for membrane protein crystallization: 仮題)

(3) "EROCOC₁₇₊₄/水"系の相挙動

得られた結果は以下のように纏められる；

脂質濃度範囲、62.7~100wt% EROCO₁₇₊₄、温度、-20, -2, +1, +20, +40, +60°C に於ける WAXS プロファイル (図 4) は ~0.48nm 近傍のブロードなプロファイルで特徴づけられる。これは、EROCOC₁₇₊₄ のイソプレノイド鎖が少なくとも -20°C までは液体状態を維持しており、EROCOC₁₇₊₄ は固相を生成しない事を意味する。これは、-60°C 3 時間インキュベート後も固体の生成が観測できなかった DSC 測定の結果とも矛盾しない。

T* = 1, 10, 20°C での相構造を、T_H = +25°C 並びに T_L = -20°C からの 2 ルートで T* に到達させた結果、T_H → T* ルートでは、いずれの T* でもキュービック相 (Q_{II}) が形成され、少なくとも 2 ヶ月 (1°C では 1 年) は実験誤差以上の変化は見られなかった。一方、T_H → T* ルートでは -20°C で形成されたラメラ相 (Lα) は、T* = 1°C で Lα + Q_{II} 2 相共存となり、時間とともに Q_{II} 相が成長し続け、20°C では 56 日後、10°C では 136 日後に Lα 相が消失し、T_H → T* ルートと同じ格子定数をもつキュービック相 (Q_{II}) が復元した。これから = 10, 20°C においては、キュービック相が安定 (平

衡) 相と結論できた。一方、T* = 1°C の場合、相変化速度が非常に遅くなり、T_L = -20°C で生成した Lα 相は 1 年後も完全に Q_{II} 相に戻らなかった。しかし、T_L = -20°C から T* = 1°C にすると Lα + Q_{II} 2 相共存となり、時間とともに Q_{II} 相が成長し続けることから、T* = 1°C では Q_{II} が安定相の一つと結論した。以上から、"EROCOC₁₇₊₄/水"系では、Q_{II} 相が 1°C までは安定と結論した。

"EROCOC₁₇₊₄/水"系では、Q_{II} 相が、60~80wt%、0~50°C の範囲で安定であり、17°C 以下で固体が安定相となる MO に比し、低温安定性に優れる脂質である。

これらの結果は、上記の 4°C での安定な SFX 測定等を可能にした要因と考えられる。

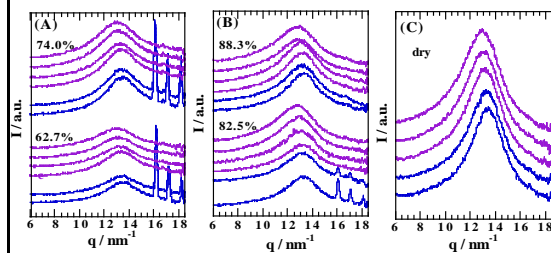


図 4. "EROCOC₁₇₊₄/水"系の EROCO₁₇₊₄ 濃度 62.7~100wt% の温度依存性 WAXS プロファイル。測定温度は下から、-20, -2°C (青), 1, 20, 40, 60°C (紫), 0°C 以下の温度、且つ 62.7, 74.0, 82.5wt% のプロファイルに観測される 3 つのシャープなピークは hexagonal ice 由来。

以上の結果は投稿準備中である (Hato M *et al.*, Physical Characteristics of an Isoprenoid Chained Lipid EROCO₁₇₊₄/Water System: 仮題)

(4) 結論

IPCL の有用性を示すため、EROCOC₁₇₊₄ を用いた A₂AR の結晶化を行ったところ、分解能 2.0~1.8 の良質な結晶が得られ、クライオ温度、4°C、20°C の三つの異なる測定温度で構造解析に成功した。これにより、IPCL は、バクテリア由来の膜タンパク質のみならず、ヒト由来膜タンパク質の結晶化にも有用であり、幅広い温度範囲で結晶構造解析を実現できる事を示すことができた。

また、"EROCOC₁₇₊₄/水"系の相挙動の解析から、EROCOC₁₇₊₄ の Q_{II} 相は少なくとも 1°C までは安定であり、低温 (4°C) での結晶化や SFX 測定が、MO に代表される MAG 脂質の様な不安定な過冷却相条件ではなく、安定な相条件で実行可能な "新規結晶化マトリクス" であると結論された。

<引用文献>

- Yamashita J, Shiono M, Hato M. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 12286, 2008
Hato M, Yamashita J, Shiono M. *J. Phys.*

Chem. B, **113**, 10196, 2009

Qiu H, Caffrey M. *Biomaterials* **21**, 223, 2000

Borshchevskiy V, Moiseeva E, Kuklin A, Bueldt G, Hato M, Gordeliy V. *J Cryst Growth* **312**, 3326, 2010

Liu W *et al. Science* **337**, 232, 2012

研究者番号：

(4)研究協力者

()

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊原 健太郎 (IHARA, Kentaro)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：90647207

(2)研究分担者

羽藤 正勝 (HATO, Masakatsu)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・嘱託職員

研究者番号：40357786

(3)連携研究者

()