

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13262

研究課題名(和文)糖脂質MPlaseライブラリーを用いた膜タンパク質膜挿入活性機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of membrane protein integration mechanism of glycolipid MPlase by using synthetic MPlase library.

研究代表者

藤川 紘樹(Fujikawa, Kohki)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・構造生命科学研究所・研究員

研究者番号：50755874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の膜タンパク質を膜挿入する働きを持った糖脂質MPlaseの作用機構解明を目的に、3糖ピロリン脂質(mini-MPlase-3)をはじめとする各種類縁体の化学合成を行い、合成標品を用いた構造活性相関研究を行った。その結果、MPlaseの糖鎖部が膜タンパク質を捕捉し、タンパク質の凝集を抑制しながら、内膜へと導くという膜タンパク質の膜挿入機構を実証する事ができた。また、MPlaseの糖鎖部にシャペロン様活性がある事、GlcNAc6位のAc基・カルボキシ基・ピロリン酸が必須である事、MPlaseの膜へのアンカリングの必要性と膜の流動性を高める効果について明らかにする事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに糖脂質が膜タンパク質の膜挿入に関与しているという報告はなく、糖脂質の酵素・シャペロン様の新機能を示すことができた。糖鎖のシャペロン様活性は、タンパク質の凝集抑制(可溶化)剤の開発につながり、タンパク質凝集が引き金になるアルツハイマー病などの疾患の解決にも応用が期待される。また、膜タンパク質を膜挿入する合成分子を初めて創出できた事から、今後、無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質の再構成効率を高める分子が多く開発され、再構成の難しい膜タンパク質研究が推進されると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the membrane protein integration mechanism of glycolipid MPlase, which has the function of inserting membrane proteins of Escherichia coli into membranes, chemical synthesis of various types of analogs, including trisaccharyl pyrophospholipid (mini-MPlase-3), was carried out and it was used for structure-activity relationship studies. As a result, the membrane protein integration mechanism in which the sugar chain of MPlase captures the membrane protein and leads to the inner membrane by suppressing protein aggregation was demonstrated. In addition, the sugar chain of MPlase has chaperone-like activity, GlcNAc 6-OAc group, a carboxy group, and pyrophosphate are essential for the activity, and anchoring MPlase to the membrane contribute increasing the fluidity of the membrane were proved.

研究分野：糖鎖合成化学

キーワード：糖脂質 膜タンパク質 膜挿入 シャペロン

## 1. 研究開始当初の背景

2006年、岩手大学の西山は、大腸菌の内膜から、いずれの膜タンパク質膜挿入経路にも必須な因子 MPlase を発見した。我々のグループは、膜タンパク質の膜挿入活性を指標に MPlase の精製を進めた結果、MPlase はタンパク質成分を含まない新規の糖脂質である事を見出した。これまでに、タンパク質の膜挿入に非タンパク質性の糖脂質が関与する知見はなく、MPlase は酵素様の糖脂質として新しい概念を提起している。我々は、大腸菌由来の MPlase を用いた構造活性相関研究から、MPlase の糖鎖部が膜タンパク質と相互作用して凝集を防ぐシャペロン様活性と、MPlase が当量以上の膜タンパク質を挿入させる酵素様活性を持つ事を明らかにした。しかしながら、「シャペロン様活性」や「酵素様膜挿入活性」を可能にしている MPlase の最小構造や立体構造など、MPlase の分子・官能基レベルでの膜挿入機構は未だ解明できていなかった。

## 2. 研究の目的

我々のグループは大腸菌の内膜から、膜タンパク質の膜挿入に必須な新因子 MPlase (Membrane Protein Integrase) を発見・同定した。意外にも、MPlase は非タンパク質性の糖脂質であり、糖鎖部が疎水性の膜タンパク質を可溶化する「シャペロン様活性」と、膜挿入させる「酵素様活性」を持つ事が示された。我々は、糖脂質 MPlase の3糖ピロリン脂質部分の化学合成を行い、合成した MPlase も微弱ながら膜タンパク質膜挿入活性を持つ事を確認した。本研究では、様々な糖鎖長やリン脂質、および機能性官能基を持つ MPlase 類縁体の系統的合成法を確立し、合成した MPlase の類縁体を用いて、MPlase の最小活性構造と膜タンパク質膜挿入機構(シャペロン・酵素様活性要因)を明らかにする事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) MPlase 類縁体の系統的な化学合成

我々は、適切に保護されたグルコサミン、グルコース、フコサミンから、MPlase の基本3糖構造の合成を行い、開発したリン酸化試薬と反応させることで、MPlase の基本骨格である3糖ピロリン脂質の合成に初めて成功している。本研究では、3糖ピロリン脂質合成の知見をもとに、最小活性構造、膜挿入機構の解明(シャペロン・酵素様活性要因の解析)に資する MPlase 類縁体を系統的に合成する。

### (2) 膜タンパク質膜挿入活性試験

我々は、MPlase と大腸菌由来のリン脂質、ジアシルグリセロールから、リポソームを作製し、無細胞タンパク質合成系に合成させた放射性  $^{35}\text{S}$  標識タンパク質(Pf3 ファージコートタンパク質)のリポソームへの取り込み量から膜挿入率を算出している。化学合成した MPlase 類縁体を随時、活性試験に供し、糖鎖の長さ、アセチル基、カルボン酸、リン酸基の有無など、糖鎖構造がもたらす膜挿入活性の差異を検証する。

### (3) 膜挿入機構の解明(シャペロン・酵素様活性要因の解析)

#### シャペロン様活性要因の解析

MPlase 類縁体を  $^{35}\text{S}$  標識タンパク質(Pf3 ファージコートタンパク質)と水溶液中で混合し、ゲルろ過カラムを行うことで、 $^{35}\text{S}$  標識タンパク質の凝集度合いを比較する。糖鎖もしくは基質タンパク質を基盤に固定化後、表面プラズモン共鳴(SPR)を測定し、得られた結合定数の比較から、シャペロン様活性に必要な構造を分子、官能基レベルで明らかにする。

#### 酵素様活性要因の解析

「合成した MPlase 類縁体」と「 $^2\text{H}$  標識リン脂質」からリポソームを作製し、固体 NMR を用いて、リン脂質の  $^2\text{H}$  を観測する事で、MPlase がリン脂質の運動性に与える影響を検証する。また、ジアシルグリセロールの脂肪酸の違い(鎖長、飽和、不飽和)と膜挿入活性との比較から、膜挿入

における膜の物理化学的な重要性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

大腸菌の膜タンパク質を膜挿入する働きを持った糖脂質 MPLase の作用機構解明を目的に、3糖ピロリン脂質(mini-MPLase-3)をはじめとする各種類縁体の化学合成を行い、合成標品を用いた構造活性相関研究を行った。MPLase 類縁体の化学合成では、適切に保護された3糖ユニットを構築し、糖鎖伸長(3糖+3糖)や蛍光官能基の導入に適用した。フコサミンユニットの3位水酸基には、蛍光官能基や糖鎖を導入するため、選択的な脱保護が可能なアリル基を配置した。またグルコサミンユニットは、 $\alpha$ グルコサミニド結合の構築のため S.-C. Hung らの報告を参考に、グルコサミンの2位にアジド基、3位にプロモベンジル基、6位に TBDPS 基をもったアクセプターを設計した。基本の3糖ユニットを効率的に合成できるようになり各種の類縁体の合成に繋がった。糖鎖伸長では、3糖ユニットをドナーおよびアクセプターへ変換し、グルコシル化反応を行ったところ、 $\alpha$ 選択的に6糖骨格を得る事ができた。結果として、6糖ピロリン脂質(mini-MPLase-6)、3糖ピロリン脂質(mini-MPLase-3, mini-MPLase-3(6-OH), mini-MPLase-3(6-OBz), mini-MPLase-3(COOMe))、3糖ジアシルグリセロール(Trisac-DAG)、3糖リン酸体(Trisac-P, Trisac-P(6-OH))などの合成に初めて成功した。これら合成標品を用いた構造活性相関の結果、MPLase の糖鎖部が膜タンパク質を捕捉し、タンパク質の凝集を抑制しながら、内膜へと導くという膜タンパク質の膜挿入機構を実証する事ができた。また、MPLase の長い糖鎖部にタンパク質の凝集を抑制するシャペロン様活性がある事、GlcNAc6-OAc 基の適度な大きさと疎水性が重要である事、MPLase のカルボキシ基やピロリン酸などの酸性の官能基が必須である事、MPLase は膜にアンカリングされている必要があり、膜の流動性を高める事などを明らかにする事ができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujikawa K., Nomura, K., Nishiyama, K. I., Shimamoto, K.	4. 巻 77
2. 論文標題 Novel Glycolipid Involved in Membrane Protein Integration: Structure and Mode of Action.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Synth. Org. Chem. Jpn.	6. 最初と最後の頁 1096-1105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1096">https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1096</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kohki Fujikawa	4. 巻 30
2. 論文標題 Glycan derivatives that possess chaperone-like activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E241-E243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.4052/tigg.1831.6E">https://doi.org/10.4052/tigg.1831.6E</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kohki Fujikawa, Sonomi Suzuki, Ryohei Nagase, Shiori Ikeda, Shoko Mori, Kaoru Nomura, Ken-ichi Nishiyama*, Keiko Shimamoto*	4. 巻 13
2. 論文標題 Syntheses and activities of the functional structures of a glycolipid essential for membrane protein integration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 2719-2727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.8b00654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kohki Fujikawa, Ken-ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Enzyme-like glycolipids MPLase involved in membrane protein integration in E. coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤川紘樹	4. 巻 29
2. 論文標題 グリコシル化反応における水素結合	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 J75-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 藤川紘樹, 鈴木苑実, 池田汐里, 森祥子, 野村薫, 西山賢一, 島本啓子
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質膜挿入に必須な糖脂質MPlase類縁体の合成
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohki Fujikawa, Sonomi Suzuki, Ryohei Nagase, Shiori Ikeda, Shoko Mori, Kaoru Nomura, Ken-ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto
2. 発表標題 Syntheses and activities of the functional structures of a glycolipid essential for membrane protein integration
3. 学会等名 29th International Carbohydrate Symposium (ICS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川紘樹, 鈴木苑実, 池田汐里, 森祥子, 野村薫, 西山賢一, 島本啓子
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質膜挿入に関与する糖脂質MPlase部分構造の合成と活性
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会(仙台)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川紘樹, 鈴木苑実, 池田汐里, 森祥子, 野村薫, 西山賢一, 島本啓子
2. 発表標題 大腸菌の膜タンパク質膜挿入に必須な糖脂質MPlase類縁体の合成と活性
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会(久留米)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohki Fujikawa, Sonomi Suzuki, Ryohei Nagase, Shiori Ikeda, Shoko Mori, Kaoru Nomura, Ken-ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto
2. 発表標題 Syntheses and activities of the functional structures of MPlase, a glycolipid essential for membrane protein integration in E. coli
3. 学会等名 The 14th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-14) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川紘樹, 鈴木苑実, 池田汐里, 森祥子, 野村薫, 西山賢一, 島本啓子
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質膜挿入に関与する糖脂質MPlase部分構造の合成と活性
3. 学会等名 第5回FCCAシンポジウム・グライコサイエンス若手フォーラム(仙台)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川紘樹, 梅川雄一, 鈴木苑実, 西山賢一, 島本啓子
2. 発表標題 大腸菌の膜タンパク質膜挿入機構解明を目指した蛍光標識MPlase類縁体の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○藤川, 西山, 島本
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明を目指した糖脂質MPlase部分構造の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ○藤川, 西山, 島本
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明を目指した糖脂質MPlase部分構造の合成
3. 学会等名 第16回新規素材探索研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ○藤川, 池田, 西山, 島本
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質挿入機構解明を目的とした糖脂質MPlase部分構造の合成
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ○藤川, 池田, 西山, 島本
2. 発表標題 大腸菌膜タンパク質膜挿入機構解明に向けた糖脂質MPlase類縁体の合成と活性
3. 学会等名 第4回新学術領域研究「反応の集積化が導く中分子戦略」若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ○Fujikawa, Ikeda, Nishiyama, Shimamoto
2. 発表標題 Syntheses of partial structures of glycolipid MPLase for elucidating the mechanism on membrane protein integration in the inner membrane of E. coli.
3. 学会等名 International Seminar on Biophysics and Chemical Biology of Biomembrane and Lipid Bilayers (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ○藤川
2. 発表標題 Syntheses of partial structures of glycolipid MPLase for elucidating the mechanism on membrane protein integration of E. coli.
3. 学会等名 第80回糖鎖科学講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 沢里克宏, 藤川紘樹, 島本啓子, 西山賢一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 8
3. 書名 化学と生物	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----