

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19485

研究課題名（和文）リン脂質類似体を用いた膜タンパク質の高分解能NMR構造解析への挑戦

研究課題名（英文）Novel Phospholipid Analogs for NMR Structural Determination of Membrane Proteins

研究代表者

松崎 勝巳（Matsuzaki, Katsumi）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00201773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質の高分解能NMR測定を目指し、脂質二分子膜環境を提供し、かつ小さなサイズで膜タンパク質を可溶化できる新規可溶化剤の開発を行った。リン脂質誘導体2種を用いることで、7回膜貫通型膜タンパク質であるバクテリオロドプシンを、NMR測定に必要な高濃度でも、直径約5 nmの小さなサイズで、40℃で1週間程度安定に可溶化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物標的の約半数は水に溶けない膜タンパク質であり、その構造を明らかにすることは薬物を設計する上で必須である。しかし、膜タンパク質の構造決定は困難なのが現状である。本研究により、膜タンパク質の精密な構造の決定が、水溶性タンパク質の構造決定に広く用いられている核磁気共鳴法により可能になる道が開かれようとしている。また、膜タンパク質を安定にハンドリングできるようになるため、創薬研究が加速される。

研究成果の概要（英文）：We have developed novel detergents that provide lipid bilayer environments and can solubilize membrane proteins with small sizes for structural determination by high resolution NMR. By combining two phospholipid derivatives, we succeeded in stably solubilizing the 7 times-transmembrane protein bacteriorhodopsin with a diameter of ca. 5 nm for a week at 40 °C.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜タンパク質 高分解能NMR 可溶化剤

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、生細胞イメージングを含む蛍光法、赤外分光法、円二色性スペクトル法などを用いて、抗菌性ペプチド、アミロイドβタンパク質などと、脂質二分子膜および生体膜の相互作用を研究し、これらペプチド・タンパク質が生理活性・毒性を発揮する分子メカニズムを明らかにしてきた。しかしながら、詳細な相互作用機構を解明する上で重要な情報である、脂質二分子膜に結合したタンパク質の立体構造を決定することは容易ではない。

多くの薬物の標的である G タンパク質共役型受容体(GPCR)等の膜貫通型タンパク質分子の構造解析手法は現在限られている。GPCR の X 線結晶構造解析は近年多数報告されているものの、これらとりうるいくつかの構造の「スナップショット」に過ぎず、膜中ではよりフレキシブルで動的な構造変化を起こしていると考えられている。そのような動的構造を捉えるには、結晶中ではなく膜環境での測定が必須である。溶液 NMR は構造変化ダイナミクスの高分解能測定が可能な手法であるが、立体構造が決定可能な分子量は最大で 80kDa 程度に制限される。リポソーム (>200 kDa)、ナノディスク (>100 kDa) 等の脂質膜環境はこの分子量より大きいため、分子量 50 kDa 程度の GPCR の立体構造決定は難しい。我々は、両親媒性の抗菌性ペプチド 2 量体の膜結合構造を決定した (Biopolymers 64, 314 (2002)) が、ペプチドが膜から水相へ解離する時の転移 NOE が観測可能な条件でのみ測定可能なため、膜貫通タンパク質のように膜に強固に結合するタンパク質には適用できない。

次善の策として界面活性剤ミセル中に可溶化することが行われるが、十分小さいサイズは得られず、しかもネイティブ構造を保持できず変性することが多い。Trial and error で「マイルド」な界面活性剤を探す手法が用いられるが限界がある。ミセルやバイセルに可溶化した 7 回膜貫通 (7TM) 型タンパク質の ^{15}N - ^1H -TROSY 化学シフト値測定や部分的なアミノ酸帰属は報告例がある (Structure 21, 394(2013), JACS 135, 1919(2013)) が、立体構造解析には至っていない。ナノディスク中で GPCR の特定のアミノ酸を標識 (^{13}C -Met) し構造変化を検出した例 (Angew. Chem. Int. Ed. 53, 13376(2014)) もあるが、分子量の大きいナノディスク中ではより多数の標識シグナルに基づく立体構造決定は難しい。

2. 研究の目的

上述の問題を解決し、膜タンパク質 NMR 測定にブレイクスルーをもたらすには、膜環境を保持しながら小サイズで膜タンパク質を可溶化できる新規デザイン化合物による可溶化法を開発する必要がある。そこで、研究代表者はこれまでに、二分子膜と似た配向で膜タンパク質周囲を覆い可溶化できるようなデザインを持つリン脂質ベースの可溶化剤 Cholyl-PC が、7TM 型タンパク質であるバクテリオロドプシン(bR) (27 kDa) を 60 kDa 程度の可溶化体として安定に可溶化でき、50 °C で少なくとも 1 週間程度ネイティブ構造を保持可能なことを見出している。しかし、Cholyl-PC は、高分解能 NMR 測定において必須となる高濃度条件において非常に大きな凝集体を形成してしまう問題点があった。本研究ではこの可溶化剤のさらなる物性改善を行い、溶液 NMR 測定への有用性を実証する。本研究が成功すれば、結晶化・従来の界面活性剤中では適切な評価ができなかった多数の膜タンパク質の構造研究の突破口になると考えられる。

3. 研究の方法

Cholyl-PC の合成は、1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Lyso-PC) と cholic acid の縮合により行った。また、Cholyl-PC 硫酸化体の合成は、Cholyl-PC を chloro sulfonic acid と反応させることにより行った。臨界ミセル濃度(cmc)測定は pyrenecarboxaldehyde 蛍光の蛍光極大波長の短波長側へのシフトを用いて行った。高度好塩菌から紫膜を調製した。紫膜からの bR の可溶化およびフォールディングは、560 nm 付近のレチナールの吸収測定により評価した。可溶化体のサイズは、蛍光相関分光法(FCS)および透過型電子顕微鏡観察により評価した。FCS 測定において、可溶化体のみのサイズを測定する場合は Rh-DOPE (10 nM) で蛍光標識した。また、bR 可溶化体のサイズを測定するために bR の Alexa Fluor 568 標識体を作製した。bR (5.4 nmol) と Alexa Fluor 568 NHS ester (505 nmol) を 0.1 M NaHCO₃ (pH8.3) 50 μL に溶解し、シリンジで時折攪拌しながら 24 h インキュベートすることで標識した。溶液を 0.1 M NaHCO₃ (pH8.3)、0.2 M KCl で wash し、さらに未反応の色素を除去するため biobeads と incubate したのち、PBS で wash した。SDS-PAGE により、未反応の色素が除去されていることを確認した。Alexa Fluor 568-bR を 2–3 nM 含むサンプルを用いて bR 可溶化体の FCS 測定を行った。

4. 研究成果

これまでの研究により、Cholyl-PC は膜タンパク質 bR を安定に可溶化するが、高分解能 NMR 測定において必須となる高濃度条件において非常に大きな凝集体を形成し、これがスペクトルの広幅化を招き構造解析が困難であった。そこで大きな凝集体形成を抑制するため、電荷を持つ硫酸基をコール酸に 1 つまたは 2 つ修飾した Cholyl-PC mono-sulf および Cholyl-PC di-sulf を合成した。これらの化合物の cmc は 200 μM 前後であり、Cholyl-PC の cmc と同程度であった。また、25°C における bR の可溶化能を調べたところ、Cholyl-PC mono-sul、Cholyl-PC di-sulf それぞれの単体、あるいは Cholyl-PC との 1/1 混合物における可溶化能は低いことが明らかになった。そこで、まず Cholyl-PC を用いて bR を可溶化した後、安定化剤として同濃度の誘導体を加えた。Cholyl-PC/Cholyl-PC 誘導体混合物中での bR は 40°C で 10 日程度安定であり、特に Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf 混合物中では高い熱安定性を示すことが明らかになった (図 1)。また、FCS および透過型電子顕微鏡観察 (図 2) により、Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf は高濃度でも直径 5 nm 程度の非常に小さなミセルを形成することが明らか

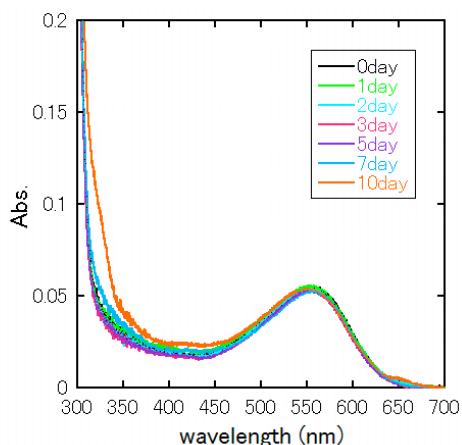


図1 Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf 混合物中に可溶化した bR のレチナールの吸収スペクトルの経時変化 (40°C)。10 日経過後も殆どスペクトルに変化がなく、bR が安定に可溶化されていることがわかる。

かになった。また、bR の Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf 可溶化体も可溶化剤のみと同程度のサイズを持つことが明らかになった。

以上の検討から、Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf 混合ミセルが、膜タンパク質のネイティブ構造を保ったまま小サイズで可溶化できる、溶液 NMR 測定に有望な可溶化剤であることが明らかになった。

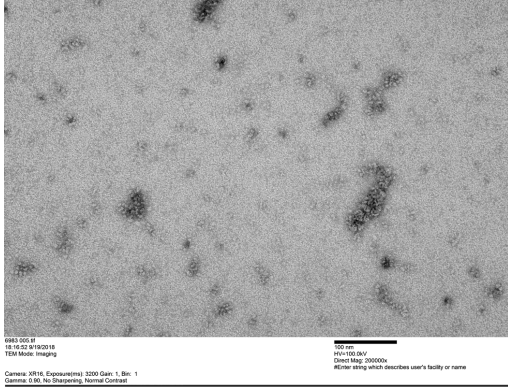


図2 Cholyl-PC / Cholyl-PC di-sulf 混合物の透過型電子顕微鏡写真

(スケールバー：100 nm)。画像解析から、粒子の長径、短径の平均値がそれぞれ 5.2 nm、4.2 nm と算出された ($n = 100$)。

5. 主な発表論文等

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：矢野 義明

ローマ字氏名：Yano Yoshiaki

所属研究機関名：京都大学

部局名：薬学研究科

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：60402799

研究分担者氏名：星野 大

ローマ字氏名：Hoshino Masaru

所属研究機関名：京都大学

部局名：薬学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70304053

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。