

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02843

研究課題名(和文)糖鎖シャペロンによる疎水性タンパク質認識の機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the recognition mechanism of hydrophobic proteins by a glycochaperone

研究代表者

島本 啓子(Shimamoto, Keiko)

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・特任研究員

研究者番号：70235638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、大腸菌内膜への膜タンパク質膜挿入において、MPlase(membrane protein integrase)と呼ばれる糖脂質が必須であることを明らかにしている。本研究では、MPlaseおよび合成類縁体とモデル基質タンパク質の分子間相互作用を物理化学的手法により解析した。表面プラズモン共鳴や飽和移動差核磁気共鳴の解析から、MPlaseのグルコサミン上の6-O-アセチル基とリン酸が、基質タンパク質の疎水性領域や塩基性アミノ酸との相互作用に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来から知られている膜挿入因子は全てタンパク質であり、MPlaseは非タンパク質性の糖脂質がはたらく初めての例である。今回、我々はMPlaseの長い糖鎖部分が疎水性の高い基質タンパク質を素早く捕捉し凝集抑制することを実証した。MPlaseがタンパク質を捕捉する機構を調べることで、膜挿入機構の全容が明らかになるだけでなく、新しい機能をもった糖脂質を探索する手がかりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A glycolipid named MPlase (membrane protein integrase), composed of a long sugar chain and pyrophospholipid, was proven essential for membrane protein integration in the inner membrane of Escherichia coli. We have reported that a synthesized minimal unit of MPlase possessing only one trisaccharide, mini-MPlase-3, involves an essential structure for the integration activity. In this study, to elucidate the mechanism of protein insertion using MPlase, we analyzed the molecular interactions between MPlase analogues and the model substrate, Pf3 coat protein, using physicochemical methods. Surface plasmon resonance (SPR) and saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD-NMR) analyses revealed that the 6-O-acetyl group on glucosamine and pyrophosphate group of MPlase play important roles in the interaction with the hydrophobic region and basic amino acids of the substrate protein.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖脂質 膜挿入 シャペロン 生体膜 糖鎖 疎水性相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜ではたらく多くの膜タンパク質が機能を正常に発揮するには、細胞内のリボソームで合成されたタンパク質が、正しい立体構造と配向性をもって細胞膜へ挿入される必要がある。親水的な環境で合成された疎水性の高い膜タンパク質を膜に挿入するための基本的な分子基盤は、全生物で保存されている重要な生命活動のプログラムの一つである。その過程には多くの因子が関わるが、我々は大腸菌内膜における膜タンパク質膜挿入の必須因子として、MPIase (Membrane Protein Integrase)を発見した。驚くべきことに MPIase はこれまでのようなタンパク質性の分子ではなく糖脂質であった(図 1)¹⁾。

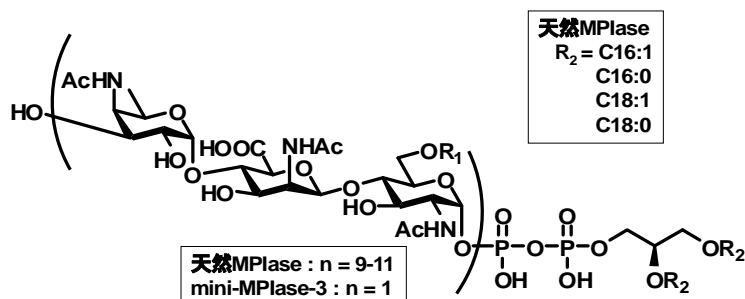


図 1 MPIase の構造

2. 研究の目的

大腸菌内膜においては、Sec トランスロコンや YidC などの膜タンパク質挿入因子が知られているが、これらは全てタンパク質であり、MPIase は非タンパク質の糖脂質がはたらく初めての例である。Sec 非依存的にリボソームから生成されたタンパク質は、補助がなければすぐに凝集してしまう。大腸菌ではリボソームと結合するシャペロンが同定されていないため、MPIase はシャペロンのようにタンパク質の凝集を防ぐはずであると考えた。MPIase がタンパク質を捕捉する機構を調べることで、膜挿入機構の全容が明らかになるだけでなく、新しい機能をもった糖脂質を探索する手がかりになる。

3. 研究の方法

我々は、MPIase の糖鎖が基質タンパク質を捕捉・凝集抑制して膜に送り込む機構を考えたが、挿入活性試験の条件は、基質タンパク質以外にもリボソームやタンパク質合成系の酵素・基質等の夾雑物が多いため、直接的な相互作用を検出することが難しい。そこで物理化学的な手法で相互作用の検出を試みた。Sec トランスロコン非依存膜挿入タンパク質としてこれまでに多くの研究実績がある Pf3 ファージのコートタンパク質 (Pf3 コート)²⁾およびその変異体と、MPIase の種々の類縁体を用いた。膜挿入の初期段階での分子間相互作用に着目し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法や飽和移動差 NMR (STD-NMR) により解析した³⁾。

4. 研究成果

(1) mini-MPIase-3 類縁体の膜挿入活性

我々は既に MPIase の最小構造である 3 糖ピロリン脂質 mini-MPIase-3 (1)に MPIase よりも弱いものの有意な膜挿入活性があることを見出している⁴⁾。また、MPIase のグルコサミンの 6 位は 3 分の 1 程度 0-アセチル化されていることに注目し、6-OH 体 (2) との活性を比較したところ、著しく活性が下がっていた。今回、新たにピロリン酸を欠いた Trisac-P (3)を合成した結果、3 の活性も 1 に比べて著しく弱かった³⁾。

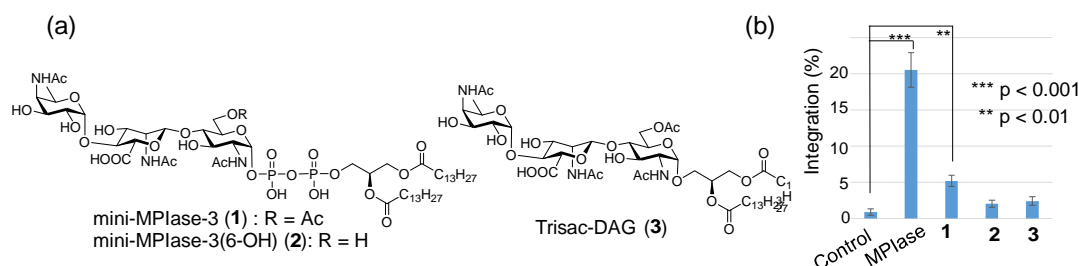


図 2 (a) 合成 mini-MPIase-3 類縁体の構造 (b) 合成類縁体の膜挿入活性

(2) MPIase によるタンパク質凝集抑制

Pf3 コート (図 3a) の溶液を調製したところ、希薄溶液でもふわふわした不溶物が生じた (図 3b)。しかし、MPIase を含む緩衝液に Pf3 コートを分散させると、目に見えるような沈殿は発生しなかった。MPIase による Pf3 コートの凝集体形成阻害が確認できたので、二次構造の変化を検出するためにタンパク質の CD スペクトルを測定した。CD スペクトルは、MPIase の存在下と非存在下で有意な差を示した (図 3c)。MPIase 非存在下の Pf3 コートは明確な二次構造を形成していなかったが、MPIase を含む緩衝液では α -ヘリックスの特徴を示している。これらの結果から、MPIase は基質タンパク質の二次構造を変化させ、ランダムな凝集構造になることを抑制し、その結果、脂質膜への挿入を促進することが明らかとなった。

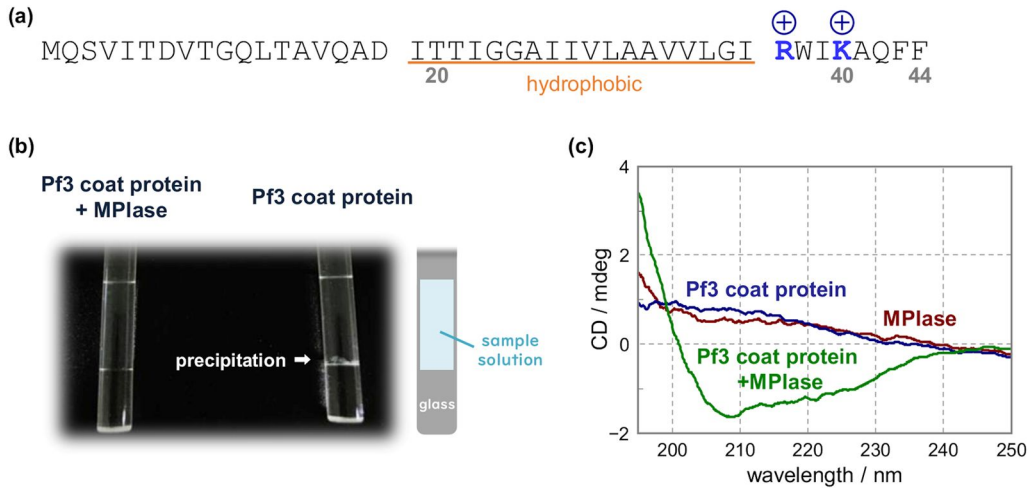


図 3 (a) Pf3 コートのアミノ酸配列 (b) ガラスチューブ中の Pf3 コート水溶液； MPIase 含有緩衝液 (左) では不溶物は生じないが、MPIase が無い場合には時間が経つと沈殿が生じる。(c) CD スペクトル； Pf3 コート単独や MPIase 単独では 2 次構造を持たないが、両者を混合すると α -ヘリックス様の構造をとるようになる。

(3) 表面プラズモン共鳴法 (SPR) による MPIase-タンパク質相互作用の解析

水溶液中の MPIase と基質タンパク質相互作用は表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価した。まず、Pf3 コートをセンサーチップのフローセルに固定化し、MPIase アナログの溶液を分析対象としてチップ上に流した。天然の MPIase が濃度依存的に Pf3 コートに結合したことから、MPIase とタンパク質との直接的な相互作用が確認された (図 4a)。解離定数 (K_D) は、定常状態親和性モデルを用いて決定された ($2.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$)。

次に、合成アナログである 1 と 3 を比較した (図 4b)。その結果、両類縁体は濃度に依存して Pf3 コートと相互作用したが、3 の応答は 1 に比べて極めて弱く、さらに 3 の K_D 値 ($136.7 \pm 32.7 \mu\text{M}$) は 1 ($2.1 \pm 1.6 \mu\text{M}$) に比べて大きかったことから、MPIase のピロリン酸基が親和性に重要であることが示唆された。

SPR で求めた親和性 (K_D 値) は MPIase と 1 で同等であったが、膜挿入活性試験では MPIase の方が 1 より圧倒的に高い活性を示していることを考えると、これは意外な結果であった。そこで、両者の結合を速度論的に解析したところ、これら 2 つの糖脂質の違いが明らかになった。MPIase の Pf3 コートへの結合と解離は、1 よりも速かった。長い糖鎖が結合と解離の速さに寄与していることが考えられる。

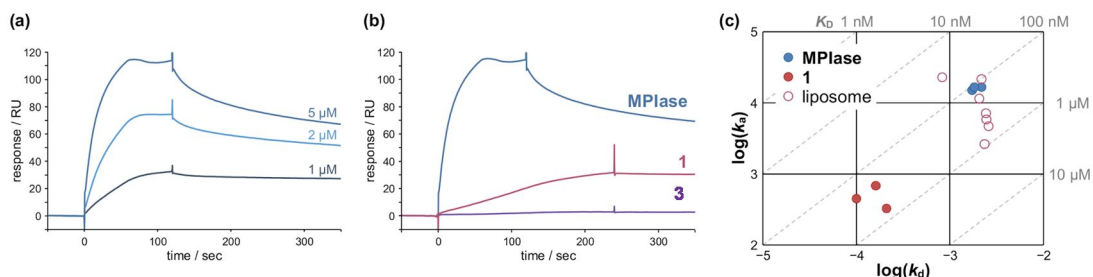


図 4 (a) Pf3 コートに対する MPIase の濃度依存性応答 (b) MPIase, 1, 3 の各 5 μL 溶液の応答 (c) 速度論的解析の On-Off rate map 表示； K_D 値は k_a と k_d の比で求められるため map の対角線上 (点線上) の点は同じ K_D 値をもつことになる。

さらに、1を含む大腸菌脂質リポソームとの相互作用について検討した。1の脂質部分は膜の中でマスクされていたが、1の濃度依存的にPf3コートと結合した。リポソームに含まれる1の見かけ上の結合速度および解離速度は、溶液中の1のそれよりも速かった。膜中の1の局所濃度が高いと、MPLaseの長い糖鎖のように3糖が集合して相互作用を早めるのかもしれない。本研究では1:1結合モデルを用いたが、分子間相互作用の化学量論が不明な場合、SPRは親和性や動力学パラメータを正確に決定することができないのは考慮すべき点である。しかし、本研究では、見かけの平衡速度が鎖長や局所濃度に依存することが示された。

(4) 3糖ユニットとタンパク質の相互作用解析

また、リン酸化糖鎖の部分構造のタンパク質との分子間相互作用への寄与を正確に調べるために、飽和移動差(STD)-NMRとドッキングシミュレーションを実施した。

脂質部位を持たない三糖類アナログ4, 5をSTD-NMR実験に用いた(図5a)。まず、STDシグナルが3糖のほとんどのプロトンから検出され(図5b)、Pf3コートと3糖が様々なコンフォメーションをとって多様な状態で結合できることが示された。次に、STDシグナルの相対強度を比較した。4のGlcNAc上の6-O-アセチル基とN-アセチル基のシグナル強度は、Fuc4NAc/ManNAc上のアセチル基とFuc4NAc上のメチル基のシグナル強度より著しく大きかったが、5では各々の値はほぼ同等であった(図5c)。

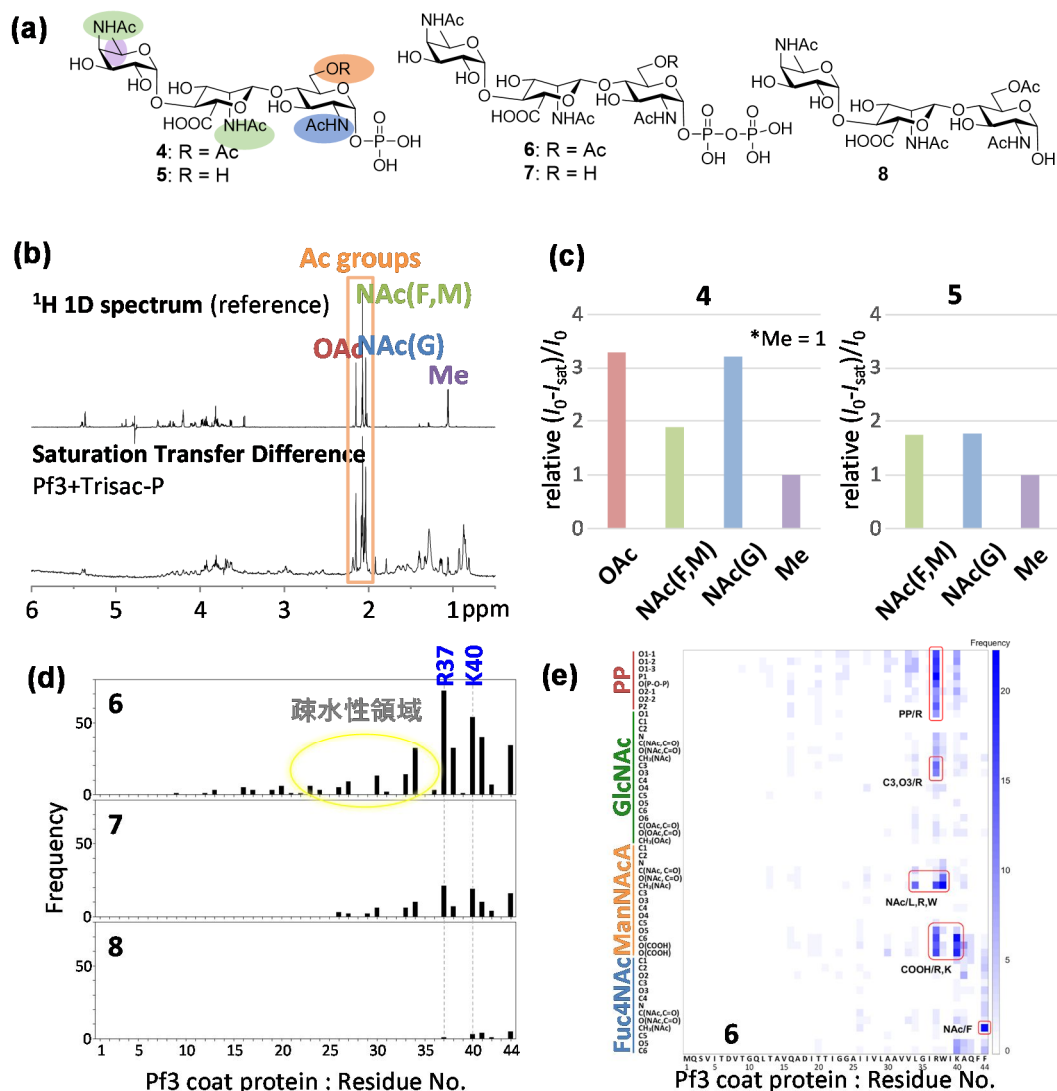


図5 (a) 解析に用いた3糖類縁体の構造 (b) 4のみの一次元¹H-NMRとタンパク質照射時のSTD-NMR; NおよびO-アセチル基や糖骨格に広くSTDシグナルが見られる。(c) FucNAcのメチル基で規格化したSTDの強度の比較; 4ではO-Ac基だけでなくGlcNAcのN-Ac基もシグナルが大きくなっている。(d) ドッキングシミュレーションで求めた各糖縁体とPf3コートの接触頻度(横軸はPf3の残基番号); 6では疎水性領域や塩基性アミノ酸との接触頻度が増えているのに対して、Ac基の無い糖縁体7では頻度が低下している。(e) 接触頻度を糖側の原子ごとに展開したヒートマップ; ピロリン酸やカルボン酸と塩基性アミノ酸、N-アセチル基と疎水性アミノ酸の接触が多いことがわかる。

次に、仮想リガンド(6, 7, 8)のドッキングシミュレーションを、Pf3 コートの各アミノ酸残基に対して実施した。ドッキングスコアの高いドッキングポーズにおける各リガンドとの接触残基の累積頻度から、Pf3 コートは7よりも6とよく相互作用し、8とはほとんど接触しないことがわかった(図5d)。累積頻度をヒートマップで展開すると、優先的な組み合わせが示された(図5e)。6は疎水性領域の残基や、タンパク質のC末端の塩基性アミノ酸残基であるArg37とLys40と頻繁に接触するため、GlcNAcとピロリン酸上の6-O-アセチル基が相互作用に重要であることが顕著であった。

(5) タンパク質側の相互作用要因

ドッキングシミュレーションでは、Pf3 コートの三糖と疎水性領域と塩基性アミノ酸の接触が示されたため、それぞれの領域を除いたPf3 コート変異体を用いてSPRを測定した。その結果、MPlaseの結合は、元のPf3 コートと比較して減少していた。さらに、高塩濃度緩衝液(650 mM NaCl)中では、Pf3 コートとMPlaseの相互作用は、従来条件(150 mM)中よりも小さくなった。高塩溶液中では、ピロリン酸残基と塩基性アミノ酸残基が関与する静電的相互作用が阻害されるのであろう。

(6) 膜挿入機構

これらの結果から、MPlaseのアセチル基とタンパク質の疎水性領域との疎水的相互作用、およびMPlaseのピロリン酸とタンパク質の塩基性残基との静電的相互作用が膜タンパク質挿入の促進に必須であると結論した(図6)。一般に膜タンパク質は、膜貫通ドメイン近傍の細胞質側ループが塩基性アミノ酸残基を多く持つ“positive inside-rule”に従うため、ほとんどの基質タンパク質でこの相互作用が保持される。以上より、MPlaseによる膜挿入機構を次のように考えた(図6)。リボソームから遊離した新生タンパク質鎖は、MPlaseの長い糖鎖に捕捉され、2次構造を変化させて凝集を免れる。この時の相互作用には、MPlaseのアセチル基やピロリン酸と基質タンパク質の疎水性領域、ピロリン酸と塩基性アミノ酸残基が重要である。タンパク質はピロリン酸との相互作用で膜表面に引き寄せられ、膜脂質とタンパク質膜貫通部位との疎水性相互作用で膜に挿入する。我々はMPlaseと膜物性との関連を調べ、ジアシルグリセロールの添加により低下した膜深部の膜脂質アシル鎖の運動性がMPlaseによる回復することも見出している⁵⁾。MPlaseはアセチル化糖とピロリン酸からなる長鎖糖脂質という構造を活用し、糖鎖のシャペロン様活性とアンカー部の膜物性変化により、大腸菌の膜挿タンパク質入りに寄与していると考えられる。

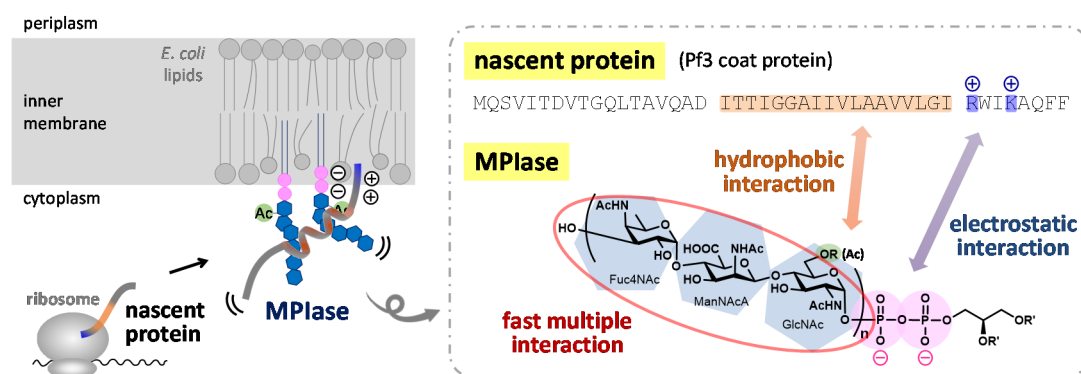


図6 MPlaseと基質タンパク質の相互作用の模式図

参考文献

- 1) Nishiyama, K., Shimamoto, K. et al., (2012) MPlase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration, *Nat. Commun.* 3, 1260.
- 2) Kuhn, A., Rohrer, J., and Gallusser, A. (1990) Bacteriophages M13 and Pf3 Tell Us How Proteins Insert into the Membrane, *J. Struct. Biol.* 104, 38–43.
- 3) Mori, S., Shimamoto, K., et al., (2022) Intermolecular interactions between a membrane protein and a glycolipid essential for membrane protein integration, *ACS Chem. Biol.* 17, 609–618.
- 4) Fujikawa, K., Shimamoto, K., et al., (2018) Syntheses and Activities of the Functional Structures of a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration, *ACS Chem. Biol.* 13, 2719–2727.
- 5) Nomura, K., Shimamoto, K. et al., (2019) Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration, *Biophys. J.* 117, 99–110

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mori Shoko, Nomura Kaoru, Fujikawa Kohki, Osawa Tsukiho, Shionyu Masafumi, Yoda Takao, Shirai Tsuyoshi, Tsuda Shugo, Yoshizawa-Kumagaye Kumiko, Masuda Shun, Nishio Hideki, Yoshiya Taku, Suzuki Sonomi, Muramoto Maki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Intermolecular Interactions between a Membrane Protein and a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 609 ~ 618 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00882 | 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 Nomura Kaoru, Yamaguchi Toshiyuki, Mori Shoko, Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimanouchi Toshinori, Tanimoto Yasushi, Morigaki Kenichi, Shimamoto Keiko | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biophysical Journal | 6. 最初と最後の頁 99 ~ 110 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.05.014 | 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 Sawasato Katsuhiko, Sato Ryo, Nishikawa Hanako, Iimura Naoki, Kamemoto Yuki, Fujikawa Kohki, Yamaguchi Toshiyuki, Kuruma Yutetsu, Tamura Yasushi, Endo Toshiya, Ueda Takuya, Shimamoto Keiko, Nishiyama Ken-ichi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration in vivo | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37809-8 | 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 Fujikawa Kohki, Nomura Kaoru, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko | 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 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan | 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) 10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1096 | 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 Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Enzyme-like Glycolipids MPlase Involved in Membrane Protein Integration of <i>E. coli</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology | 6. 最初と最後の頁 E151 ~ E158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1705.1E | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 大澤、藤川、韓、西山、島本 |
| 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のピロリン酸部の重要性の解析 |
| 3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 韓、藤川、大澤、村本、島本、西山 |
| 2. 発表標題 タンパク質膜挿入に関与する糖脂質 MPlaseの化学合成類縁体を用いた構造機能解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤川、大澤、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的とした糖脂質MPlase類縁体の合成 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤川、韓、大澤、森、野村、西山、島本 |
| 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の活性部分構造と作用機構の解明 |
| 3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森、野村、藤川、大澤、西山、島本 |
| 2. 発表標題 膜蛋白質膜挿入に関わる糖脂質因子と基質蛋白質の相互作用解析 |
| 3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野村、山口、森、藤川、西山、島内、谷本、森垣、島本 |
| 2. 発表標題 蛋白質膜挿入促進因子MPlaseと抑制因子DAGによる膜物性変化 |
| 3. 学会等名 日本膜学会第43年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森、野村、山口、藤川、大澤、西山、島本 |
| 2. 発表標題 Analyses of the Effects of MPlase on Protein Integration and Membrane Properties |
| 3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 島本啓子 |
| 2. 発表標題 タンパク質膜輸送の鍵を握る糖脂質：有機化学からのアプローチ |
| 3. 学会等名 第31回万有仙台シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 島本 |
| 2. 発表標題 糖脂質MPlase合成類縁体による膜挿入酵素様活性の機構解明 |
| 3. 学会等名 「中分子戦略」とりまとめシンポジウム |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 島本 |
| 2. 発表標題 酵素みたいな(?)糖脂質 MPlaseの構造と機能 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第81回講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤川, 鈴木, 池田, 森, 野村, 西山, 島本 |
| 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 森,野村,山口,藤川,島本 |
| 2. 発表標題 蛋白質膜挿入因子MP1ase の作用機構解明に向けた膜物性変化と相互作用解析 |
| 3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |