

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20710174

研究課題名 (和文) 膜蛋白質輸送機構に関する機能性糖脂質の化学的研究

研究課題名 (英文) Chemical approach for elucidating structure and function of a novel glycolipid stimulating the membrane-protein integration.

研究代表者

前田 将秀 (MAEDA MASAHIDE)

財団法人 財団法人サントリー生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：80462290

研究成果の概要 (和文)：

大腸菌において細胞質で合成された蛋白質が細胞膜へ挿入される過程は、SecYEG などの蛋白質群により厳密に調整されている。最近、この挿入過程に関わる非蛋白質性の膜挿入因子が新たに見出された。本研究では、大腸菌より得られる細胞膜抽出成分から精製を行い、この膜挿入因子の高濃縮に成功した。さらに、各種スペクトル解析により膜挿入因子の全体構造を推定するに至った。

研究成果の概要 (英文)：

Integration of membrane-proteins into lipid membranes is strictly regulated with translocon, such as SecYEG complex and YidC. Recently, a novel integration-stimulating factor, suggested a sort of glycolipid, was found out in this integration process. In this study, we succeeded in extraction and purification of this factor from *E. coli* strain MC4100 and assumed a total structure of this integration factor by structural data obtained by NMR and MS analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

複合新領域

科研費の分科・細目：

生物分子科学・生物分子科学

キーワード：

天然物有機化学・複合糖脂質・膜蛋白質輸送・構造解析

1. 研究開始当初の背景

細胞質で合成された蛋白質が細胞膜へ挿

入される機構については多くの研究が積み重ねられており、その輸送機構の詳細な解明

は生命現象の理解という点からも重要な課題の一つである。大腸菌を用いてこの問題を研究していた岩手大学 西山賢一教授らは、従来から蛋白質輸送を担う事が知られていた SecYEG などの蛋白質群とともに働く未知の因子の存在を見出した。さらに、この因子は大腸菌の外膜構成成分として知られるリポ多糖と類似した挙動を示すことが明らかとなった。蛋白質輸送機構は、国内外の多くの研究者によって活発に研究されていたが、全て蛋白質性因子を対象としたものであった。このようなリポ多糖類似の分子が、外膜構成成分や自然免疫誘導成分として以外に、菌自身の細胞生物学的な機能に關与していることは、これまで報告された例がない。また、蛋白質膜輸送機構の全容解明という視点からも興味深い事例であり、新たに見出された因子の同定が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究は、グラム陰性細菌における蛋白質の膜への挿入過程に機能することが見出された糖脂質性因子を化学的に同定し、その機能解明により、糖脂質の新たな細胞内機能の提示と、統一的な蛋白質膜輸送・挿入モデルの提唱を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1)大腸菌 Ra 変異株を研究協力者である西山らより受け、膜挿入因子の大量抽出法の検討を行う。特に、リポ多糖類似の糖脂質性分子の可能性があるため LPS 抽出法を基にした抽出法を検討する。

(2)抽出成分をイオン交換カラム、疎水性カラムなど様々な性質を持ったカラムを用いて分離を試み、膜挿入活性を指標に因子の精製を行う。

(3)精製した因子を用いて NMR や MS などの分析機器を用いて構造を解析し、既知の Ra-LPS との比較を行う。機器分析のみで解析することが困難な場合は、酸、アルカリ、酵素処理などをおこなうことで部分分解反応を行い、因子の組成を推測する。得られた構成成分について、NMR や MS を用いて解析し、必要に応じて、化学修飾を行い解析することで構造を決定する。特に糖鎖部については、NMR や MS による直接解析とともに、メチル化分析により結合様式を決定する。これらの解析をもとに、因子の構造を決定する。

(4)推定構造を既知の糖脂質の合成法を参考に化学合成し、推定構造が活性本体であることを実証する。

4. 研究成果

(1)膜挿入因子の精製

①膜挿入因子は LPS 様の分子の可能性も示唆されていたことから、LPS 抽出法を活用した膜挿入因子の精製を検討し、フェノール・クロロホルム・石油エーテル法が再現性良く簡便に菌体から LPS とともに膜挿入活性成分を抽出できる手法であることを見出した。さらに、陰イオン交換カラム、疎水性カラム、逆層シリカゲルカラム、ゲルろ過カラムなど複数のカラムを組み合わせた分離操作により、活性とは無関係な LPS を除去し、活性成分の濃縮に成功した。

②一方、大腸菌の内膜成分を用いて膜挿入因子の濃縮についても検討した。常法により得られる内膜成分を陰イオン交換カラムと液-液分配カラムにより順次分離を行うことで、内膜成分からの膜挿入因子の高濃縮にも成功した。

③外膜由来の膜挿入活性成分と内膜由来の膜挿入活性成分を、NMR による解析、さらに弱酸加熱処理による比較検討した結果、互いの活性本体は異なる分子であることが明らかとなった。これは外膜と内膜にそれぞれ異なる膜挿入活性機構が存在する可能性を示している。特に外膜由来の活性成分は Kdo 切断条件において膜挿入活性が消失することから、LPS 誘導体の可能性も考えられる。

(2)膜挿入因子の構造解析

(1)の結果を受け、以後、特に重要な生物学的意義を持つ内膜上で機能する内膜由来の膜挿入因子に注目し、詳細に解析を行った。

①内膜由来の膜挿入因子の構成成分の解析のため、組成分析を行った。精製した膜挿入因子を様々な酸性条件で酸加水分解を行い、アミノ酸、中性糖、脂肪酸、ならびにアミノ糖についての解析を行った結果、まず膜挿入

因子には、アミノ酸が存在しないことが明らかとなった。さらに、中性糖についても構造内には存在しないが、脂肪酸については、大腸菌に一般的な脂肪酸が観測された。一方、アミノ糖の解析では、グルコサミンの検出とともに大量のアンモニアが検出された。これら知見より、構成成分としてグルコサミンに加え、酸加水分解に不安定なアミノ糖を主とする構造を有していることを推察した。

また、上記のアミノ酸解析の結果から、膜挿入因子が非蛋白質性の分子であることが実証できた。

②内膜由来膜挿入因子を直接 MALDI-TOFMS および MSMS 解析を行った結果、分子量が約 10,000 を超える分子であること、さらに3つのユニットから構成されるある一定の繰り返し構造を有していることが明らかになるとともに、1つのユニットにはアセチル基の修飾の有無が存在することが推察された。さらに、フェニルジアゾメタンによりベンジルエステル化反応を行った後、再度 MALDI-TOFMS 解析することで、3つのユニットの内の1つのユニットにアニオン性官能基を有することが推察された。

③内膜由来膜挿入因子を直接 ^1H NMR 解析することで、3つの *N*-アセチル基の存在、および3種類の糖のアノマー位と考えられるプロトンが観測された。さらに ^{31}P NMR の測定により、ジリン酸ジエステル結合の存在が示唆されたことに加え、一方のリン酸基については上述の糖のアノマー位と考えられるプロトンとの相関が確認された。

以上のことから、3つの繰り返し構造はいずれもアミノ糖で構成された糖鎖であり、還元末端はリン酸基と結合していると推測した。

さらに、48%フッ化水素酸水溶液およびアルカリ水溶液による処理で、脂質部位と上述のアセチル基の部分修飾を除去できることを見出した。このことは、アセチル基の部分修飾は、*O*-アセチル型の修飾であること、および脂肪酸についても通常のエステル型結合のみが構造内に存在することが明らかとなった。

上記①、②および③の結果を総合的に考え、膜挿入因子には脂質部位と構造の大部分を占める一定の繰り返し糖鎖が存在し、この糖の繰り返し構造は、いずれもアミノ糖で構成されており、それらは *N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチル基を有したウロン酸、さらに *N*-アセチル基を有した 6-デオキシヘキソ-

スであり、*O*-アセチル基の部分修飾は、*N*-アセチルグルコサミン上に存在すると推察できた。

④膜挿入因子の糖鎖部位のみを取り出し、メチルグリコシドへと変換後、GC-MS を用いて解析を行うと、単純な3本のピークが観測された。これを標準サンプルおよび合成品を用いて比較解析を行うことで、3つの構成糖をいずれも同定するに至った。

⑤さらに、④で用いた糖成分と同じものを (*S*)-(+)-2-ブタノールで処理することで、ブチルグリコシドへと変換し、GC-MS で標品サンプルと比較解析することで、3つの糖はいずれも D 型の糖であることが明らかとなった。

⑦また、同様に④で用いた糖成分を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、誘導体化し、同様に GC-MS で解析することで、還元末端の糖が *N*-アセチルグルコサミンであることも明らかとなった。

⑧一方、脂質部に関しては、48%フッ化水素酸水溶液処理により得られる脂質部を Q-ToF 解析、ならびに、塩酸/メタノール処理とトリメチルシリル化後の GC-MS 解析によりジアシルグリセロール構造が示唆されるとともに、脂肪酸のアシル鎖の種類には自由度があることが明らかとなった。また、アルカリ処理後に得られる脂質部位を用いて、トリメチルシリル化後の GC-MS 解析により、リン酸とグリセロールの結合が明らかとなった。

以上①～⑧の知見より、膜挿入因子の全体像は、ジリン酸ジエステル結合を介して、ジアシルグリセロール構造と3種類のアミノ糖で構成される繰り返し糖鎖構造とが結合した形を成しており、その分子量は約 10,000 にもなることが明らかとなった。

今後は、上記知見に加え、糖鎖部に対して、メチル化分析を行うことで、糖の結合様式を確定し、膜挿入因子の全体構造を決定する。また、確定した構造を実際に化学合成し、活性を検証することで膜挿入活性の本体であることを確認する。

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 1 件)

Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T., Tokuda, H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 394(3), 733-736, 2010.

A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein.

査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：大腸菌膜タンパク質挿入因子

発明者：楠本正一、島本啓子、前田将秀、

西山賢一、徳田元、上田卓也、金森崇

権利者：サントリーホールディングス株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-048520

出願年月日：22年3月5日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 将秀 (MAEDA MASAhide)

(財)サントリー生物有機科学研究所・

研究員

研究者番号：80462290

(2) 研究協力者

西山 賢一 (NISHIYAMA KEN-ICHI)

岩手大学 農学部附属寒冷バイオフロン

ティア研究センター・教授

研究者番号：80291334