

令和 5 年 4 月 3 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05738

研究課題名(和文) シャペロン様糖脂質MPlaseの膜上挙動観察と膜タンパク質膜挿入促進剤の開発

研究課題名(英文) Observation of chaperone-like glycolipid MPlase behavior on membranes and development of membrane protein integration enhancers

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の膜タンパク質を内膜へ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各種MPlase類縁体を化学合成し、均一な標品を用いた構造活性相関研究を実施した。その結果、トランスロコン非依存型の膜タンパク質膜挿入として、MPlaseの糖鎖部がリボソームで合成された新生タンパク質を捕捉し、凝集を抑制しつつ、ピロリン酸によって膜表面へと誘導後、膜挿入を行い、膜シャペロンYidCへと引き渡す事で、自身の挿入活性を再生するという機構を実証する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は全ての生物に存在し、膜タンパク質膜挿入の基本的なメカニズムは全生物に保存されている。我々は、大腸菌をモデル生物として、糖脂質MPlaseが関与する膜タンパク質の膜挿入機構の一端を明らかにした。糖脂質MPlaseは糖鎖でありながら、タンパク質の凝集を抑制する活性を持ち、膜タンパク質の膜挿入を行う。さらに、膜シャペロンYidCと連携してタンパク質の膜挿入効率を高めることが明らかとなった。本成果は、大腸菌における糖脂質の新しい役割を示すとともに、糖鎖構造をモチーフとしたタンパク質凝集抑制剤の開発や膜タンパク質再構成技術の向上にも応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of action of the glycolipid MPlase, which inserts membrane proteins into the inner membrane of *E. coli*, various MPlase analogues were chemically synthesized and structure-activity relationship studies were performed using homogeneous samples. As a result, we demonstrated that, as a translocon-independent membrane protein integration of *E. coli*, the glycan moiety of MPlase captures the nascent protein synthesized from the ribosome, inhibits its aggregation, guides it to the membrane surface by pyrophosphate, and then inserts it into the inner membrane, where it is transferred to the membrane chaperone YidC to regenerate its own insertion activity.

研究分野：糖鎖合成化学

キーワード：膜タンパク質膜挿入 糖鎖シャペロン

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質を生体膜に挿入する過程は、トランスロコンと呼ばれる膜タンパク質複合体が担っている。トランスロコンは分泌タンパク質の膜透過も行っており、原核生物から真核生物まで相同性が高いことから、全生物に保存された経路であると考えられている。一方、小型タンパク質の膜挿入では、トランスロコン非依存的な経路も知られている。共同研究者の西山(岩手大)は、大腸菌の内膜から、いずれの経路にも必須な因子 MPlase を発見した(Nishiyama K. et al, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 35667.)。我々のグループは、MPlase がタンパク質成分を含まない新規の糖脂質であると同定した(Nishiyama K., Shimamoto K. et al, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1260.)。さらに MPlase 類縁体の化学合成法を開発し、3 糖ピロリン脂質(mini-MPlase-3)等の合成類縁体も有意な活性を示す事を見出した(Fujikawa K. et al, *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 2719.)。これまでの研究から、MPlase の糖鎖部が新生タンパク質を捕捉し、タンパク質の凝集を抑制するシャペロン様の活性を発揮しながら、内膜の流動性の高まった領域へ挿入させるという作用機構が明らかとなった。しかしながら、MPlase の特徴的な官能基の役割や糖鎖長の意義、膜タンパク質(トランスロコン、YidC)との連携は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究は、膜タンパク質の膜挿入活性をもった特異な糖脂質 MPlase の機能を、化学合成した均一な MPlase 類縁体を用いて検証する点に特徴がある。生合成に関わる遺伝子や酵素が未同定の MPlase は、内膜での存在量が極微量であり、糖鎖の長さ、アセチル基の数や位置、脂肪酸の組成に多様性が存在するために均一な分子を用いた解析が難しい。本研究では、(1)膜タンパク質の膜挿入活性、基質タンパク質との相互作用、膜タンパク質(トランスロコン、YidC)との連携を化学合成した MPlase 類縁体を用いて検証し、より詳細な膜タンパク質膜挿入機構を明らかにする事と(2)膜タンパク質の再構成(膜挿入)効率を高める人工糖鎖シャペロンを創製する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) MPlase 類縁体の系統的合成

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、3 糖単位で糖鎖を伸長する戦略により、9 糖ピロリン脂質(mini-MPlase-9)をはじめとする各種類縁体の合成を行う。

(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 ³⁵S 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

と膜挿入活性の相関を検証する。

(3) MPlase と基質タンパク質の相互作用解析

MPlase 類縁体と基質タンパク質(Pf3 ファージコートタンパク質)の相互作用を表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて解析する。基質タンパク質を基盤に固定化後、アナライトとして MPlase 類縁体を流し、得られた結合定数の比較から、相互作用に必要な構造を分子、官能基レベルで明らかにする。また、円二色性(CD)スペクトルを用いて、基質タンパク質の立体構造変化(シャペロン様活性)に必要な糖鎖構造を検証する。

4 . 研究成果

天然 MPlase の微量性、不均一性を克服するため、MPlase 類縁体の系統的合成法を開発し、純粹な天然型および非天然型標品を十分量得る事ができた。合成標品を用いた官能基レベルでの構造活性相関研究から、MPlase の GlcNAc 6-OAc 基、カルボキシ基、ピロリン酸の膜タンパク質膜挿入活性への寄与と、糖鎖伸長に応じた活性の向上が明らかとなった。また、9 糖以上のリン酸化糖鎖に挿入活性を向上させる効果があり、糖鎖長依存的にタンパク質の凝集抑制活性が発現される可能性が示された。さらに合成した MPlase 類縁体で膜シャペロン YidC との相乗効果が確認され、MPlase の膜挿入効率を YidC が向上させる事が実証された。本結果から、大腸菌内膜におけるトランスロコン非依存型膜挿入として、MPlase が特徴的な官能基を介して、疎水性の高い膜タンパク質を捕まえ凝集を抑制し、膜表面のピロリン酸で引き寄せ膜挿入した基質タンパク質を YidC に引き渡す事で、MPlase の触媒的な挿入活性(凝集抑制活性、酵素様活性)が再生するという機構を提案する事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Kohki Fujikawa, Youjung Han, Tsukiho Osawa, Shoko Mori, Kaoru Nomura, Maki Muramoto, Ken-ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural Requirements of a Glycolipid MPLase for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202300437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202300437	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 Kaoru Nomura, Shoko Mori, Kohki Fujikawa, Tsukiho Osawa, Shugo Tsuda, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Shun Masuda, Hideki Nishio, Taku Yoshiya, Takao Yoda, Masafumi Shionyu, Tsuyoshi Shirai, Ken-Ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of a bacterial glycolipid in Sec-independent membrane protein insertion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 12231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16304-1	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 Shoko Mori, Kaoru Nomura, Kohki Fujikawa, Tsukiho Osawa, Masafumi Shionyu, Takao Yoda, Tsuyoshi Shirai, Shugo Tsuda, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Shun Masuda, Hideki Nishio, Taku Yoshiya, Sonomi Suzuki, Maki Muramoto, Ken-Ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto	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 Kohki Fujikawa, Shoko Mori, Ken-Ichi Nishiyama, Keiko Shimamoto	4. 巻 81
2. 論文標題 A bacterial glycolipid essential for membrane protein integration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry	6. 最初と最後の頁 95-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.accb.2022.09.005	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤川 紘樹, Han Youjung, 大澤 月穂, 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の構造活性相關研究
3. 学会等名 第41回日本糖質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤川 紘樹
2. 発表標題 大腸菌糖脂質の希少性、不均一性に化学合成で挑む
3. 学会等名 第41回日本糖質学会（招待講演）
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 Kohki Fujikawa
2. 発表標題 Syntheses of Partial Structures of Glycolipid MPlase Essential for Membrane Protein Integration in E. coli
3. 学会等名 Asian Carbohydrate Chemistry and Glycobiology Webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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 (オンライン)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 構造生命科学部 業績
http://www.sunbor.or.jp/rd/file/101_2020.pdf

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
---------	---------