

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H05367・20K20376

研究課題名（和文）膜蛋白質結晶中の脂質二重膜の可視化技術の開発

研究課題名（英文）Development of technology for visualising lipid bilayers in crystals of membrane proteins

研究代表者

豊島 近（Toyoshima, Chikashi）

東京大学・定量生命科学研究所・特任教授

研究者番号：70172210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,700,000円

研究成果の概要（和文）：膜蛋白質の真の構造生物学を目指し、「脂質二重膜からプロトンまで」の全てを可視化する技術の開発に取り組んでいる。第一の目標は膜蛋白質結晶中の脂質二重膜の可視化であり、具体的課題は分解能10よりも低角の反射点の位相決定である。溶媒コントラスト変調法の拡張と多重同型置換法、その両者の組み合わせの適用を考え、技術開発とデータ収集を行った。さらに、中性子回折への発展を考え、膜蛋白質の大型結晶の作製技術の開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、低角反射に対する位相決定技術が拡充され、既に実績のある溶媒コントラスト変調法に関しても適用できる結晶が大幅に拡大した。その結果、これまでX線結晶解析が機能しないためにごく限られた知見しかない、燐脂質と膜蛋白質との相互作用の詳細を明らかにすることが可能になった他、蛋白質結晶中で熱運動が大きくて解像できなかった糖鎖等も解像できるようになった。クライオ電子顕微鏡法では燐脂質頭部が解像されないことが多いため、本研究で開発した技術との組み合わせも追及されるべきであろう

研究成果の概要（英文）：Aiming at a truly comprehensive structural biology of membrane proteins, we have been developing technology for visualizing all components, from protons to lipid bilayers, required for functioning of membrane proteins. Our first goal is to establish the methods for visualizing lipid bilayers in crystals of membrane proteins, or determining phases of reflections at lower than 10 Angstrom resolution. For that purpose, we designed X-ray solvent contrast modulation, multiple isomorphous replacements and their combinations, and carried out extensive measurements using crystals of ion pumps. Furthermore, we tried to develop methodology for generating larger crystals of membrane proteins aiming at the solvent contrast modulation using neutron diffraction.

研究分野：構造生物学

キーワード：脂質二重膜 X線結晶解析 膜蛋白質 結晶

1. 研究開始当初の背景

蛋白質そのものに関する我々の知識は、この10年間に、飛躍的に増大した。一方、膜蛋白質が活動する場である脂質二重膜そのもの、或いはその構成成分である磷脂質(+ コレステロール)と蛋白質の相互作用に関する知識は極めて乏しく、Singer & Nicolsonの流動モザイクモデル(1972)からほとんど進歩していない。それは、膜蛋白質の構造決定には大変威力のあったX線結晶解析がこの目的には無力であったためである。膜の構成成分である磷脂質の柔軟性から、脂質二重膜からの寄与は分解能10 Åよりも低角で急激に大きくなるが、この部分を無視しても膜蛋白質そのものの原子モデルは構築可能である。そのため、膜の存在は無視し、蛋白質の周りは均一な溶媒で埋められているとして解析が依然として行なわれている。従って、膜蛋白質のすべての結晶構造解析は誤りを含んでいる可能性がある。一方、私達の研究から、代表的な膜輸送体であるカルシウムポンプでは、脂質二重膜と蛋白質との相互作用は機能発現のメカニズムの一部として組み込まれていることが判った。このようなメカニズムは膜蛋白質一般に共通であろうから、脂質二重膜は単に膜蛋白質が浮いている海のようなものではなく、もっと能動的な役割を持っているに違いない。それを明らかにするためには、膜蛋白質結晶中の脂質二重膜を可視化する技術を確認し、磷脂質と膜蛋白質との相互作用の詳細を明らかにする必要があるが、そのような技術は私たちが開発した溶媒コントラスト変調法しかなかった。しかも、適用できる結晶は複数の理由によって限定されており、その拡充と新手法の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

私達が目指すところは、膜蛋白質の機能発現に必要な「脂質二重膜からプロトンまで」を含む真の構造生物学を遂行することである。その目標に向けた第一のゴールは、膜蛋白質結晶中の脂質二重膜を可視化する技術を確認し、磷脂質と膜蛋白質との相互作用の詳細を明らかにすることである。具体的には、脂質二重膜からの寄与が大きい分解能10 Åよりも低角の反射点の位相を決定する技術を確認することである。そのために、一つには、私達が独自に開発してきたX線溶媒コントラスト変調法を拡充し、適用可能な膜蛋白質結晶を増やすことを目指す。究極の目標は、中性子線回折の適用であり、原理的には水素原子やプロトンの可視化まで可能になる。しかし、現実には中性子線の強度不足は如何ともし難く、X線結晶解析に必要な結晶に比べてはるかに大きなものが必要である。その準備として、膜蛋白質結晶の大型化の方策を検討する。一方で、溶媒コントラスト変調法は脂質二重膜の初期モデルを必要とし、曖昧さは原理的にどうしても残る。そのために、モデルを必要としない多重同型置換法等による位相決定法をも検討する。

3. 研究の方法

(1) 第一の目標である低角の反射点に対する位相決定の方法として、①重原子多重同型置換法(MIR/MIRAS)と②溶媒コントラスト変調法、③その両者の組み合わせを考えた。

①MIRは結晶を重原子を含む溶液に浸漬し、異なる位置に結合した重原子による反射強度の変化から位相を決定するという、X線結晶解析における位相決定の標準的方法である。しかし、極低角では重原子による溶媒の電子密度の変化等の技術的問題が顕著になり、私達が知る限り、MIRによる極低角の位相決定の成功例は無い。この目的のためにはi) 適切な重原子クラスターの発見、ii) データ収集ソフトウェアの拡充、iii) 重原子クラスターの散乱因子の計算、iv) 位相決定のためのソフトウェアの開発が必要となる。

②溶媒コントラスト変調法は、中性子回折による膜蛋白質結晶中の界面活性剤ミセルの可視化のために使われてきたが、中性子線の強度と解析手法の問題のために、10 Å分解能にとどまっている。申請者は、中性子線に対しコントラスト変調という観点からは圧倒的に不利な、X線を用いた溶媒コントラスト変調法の開発に、溶媒置換率という概念を導入することで成功し、4状態のカルシウムポンプ結晶に適用した。その結果、脂質二重膜と膜蛋白質の相互作用の詳細を解明し、膜蛋白質の構造生物学に大きな進歩をもたらすことができた。しかし、開発したソフトウェアの制限から適用できる結晶系が限定されていたので、まずはその拡充を目指した。またコントラスト変調剤の濃度を変えることによる結晶格子の変化に対処する方法の開発も必要であった。この過程はSPRING-8でデータ収集を行って検討する必要があり、多大な時間を要することになった。

(2) 第二の目標である膜蛋白質結晶の大型化に関しては、先ずは基本となる①相図を作成すること、それに基づいて②種結晶を使う、或いは植え継ぎを行うこと、③結晶成長に伴い不足する蛋白質を添加する方法を開発することを試みることにした。対象としては、非常に大量の蛋白質を必要とするため、筋小胞体カルシウムポンプ結晶を用いることとした。この結晶は、外部から磷脂質を添加して得られる結晶であり、結晶内に脂質二重膜が形成されているという特徴があり、いわゆる可溶性蛋白質の結晶化とは大きく異なる。微量透析法と蒸気拡散法のどちらでも結晶化条件は確立しており、異なった手法を試せる利点もある。

4. 研究成果

(1) 低角反射点の位相決定に関しては、第一に①重原子同型置換法の適用を目指し、i) カルシウムポンプ、ナトリウムポンプ結晶を用いて重原子クラスターの探索を行った。この結果、反応性も高く有効なクラスターとして、古典的な $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ 、最近導入された $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$ (TEW)、電子顕微鏡の染色剤にも使われるリンタングステン酸 $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ が有効であることを見出した。たとえば $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ の場合、総電子数は 856 あり、 Pt^{2+} の 76 に比べ、低角では 10 倍以上の散乱振幅があるから、位相決定に大きく寄与することが期待される。二つのポンプ蛋白質結晶を用い、低角部分はすべての反射点の回折強度データを SPring-8 BL41XU において収集した。図 1 にナトリウムポンプ結晶中の脂質二重膜部分の予備的な電子密度図 ($175-7 \text{ \AA}$ 分解能の反射点を使用、 1σ) を示す。これは、既存ソフトウェアにより 7 個の重原子置換体を組み合わせ得た位相を用いて計算したものである。まだノイズは多いものの、ヘリックスの位置等は正しく、また、脂質二重膜の電子密度も観察され、初期段階のデータとして希望が持てるものである。

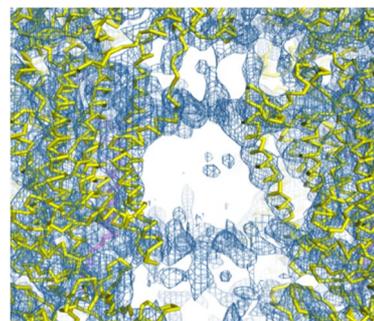


図 1. 重原子同型置換法によるナトリウムポンプ結晶中の脂質二重膜の解像。膜面に平行にみたもの。黄色の棒は通常の結晶解析によって決定した蛋白質部分の原子モデル。

ii) データ収集に当たっては、通常の結晶解析と異なり、低角の反射点の測定精度が問題になる。特に、結晶の同型性と回折データのスケージングの問題が顕著になる。その検討のために、個々の反射点の強度情報に関し、詳細な統計を明示するプログラムを作成した。iii) 重原子クラスターの利用に関しては、既存のソフトウェアでは対処しきれない問題が幾つもある。通常の MIR では重原子は点として扱う。点であるから方向はなく、原子散乱因子と占有率、温度因子のみを考えればよい。一方、重原子クラスターの場合、たとえば $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ では二つの球殻からなり、中心には原子は無い。従って、球殻間の干渉があり、方向性がない場合でも super atom としてこのクラスターを扱うことには無理があるが、既存ソフトウェアではそれ以外の扱い方はできない。特に、TEW のように板状であると明快な方向性があり、位相決定に対する問題は顕著である。クラスターを構成する原子を独立に扱える場合には問題ないのだが、一般に重原子の結合はごく弱く、クラスターの方向が決まらないことの方が多い。その場合には、平均電子密度を考える必要がある。

このような問題の解決のためには、また、精密化における masking の問題 (脂質二重膜のバルクの部分の殆ど一様な電子密度を原子モデルで表現することは困難である) の回避のためにも、実空間で処理すること、すなわち、iv) 電子密度図中に蛋白質や脂質二重膜の原子モデルと重原子の電子密度モデルを埋め込み、それから逆空間の反射強度を計算する、というプログラムを作成する必要がある。 $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ に関しては電子密度分布を密度汎函数法を用いて量子化学的に計算し、逆空間に戻して強度変化を評価することができた (図 2)。この結果、このクラスターが方向性を失って結合している場合、(0,0,1) 反射のように分解能 100 \AA を越えるような反射点に対しては Pt^{2+} の 10 倍の寄与を期待できるものの、その効果は急激に減少し、分解能 7 \AA を越える反射点に関しては Pt^{2+} の効果の方が大きくなること、また、分解能 5 \AA までは、原子散乱因子の標準的近似式で良く近似できることが判明した。このことは、逆空間での解析もある程度可能であることを意味している。いずれにせよ、手法的には確立できたので、他のクラスターに関しても計算を進めている。また一方で、既存プログラムを用いて計算した重原子置換による低角位相と蛋白質由来の位相を単に結合するだけでも、これまで不可能であった燐脂質や糖鎖のモデリングが可能になることも判明した。

このように、まだ完成には至っていないが、重原子置換体を用いる低角反射点の位相決定法の目途は立ったと言える。一方で、クライオ電子顕微鏡法により、膜蛋白質に付随した燐脂質はある程度解像されるようになってきている。しかし、多くの場合、クライオ電顕に供される膜蛋白質は界面活性剤のミセル中にあり、また負電荷を有する燐脂質頭部は原理的に解像されにくいので、頭部を欠いたアシル鎖部分のみが解像されることも多い。蛋白質との相互作用で重要なのは燐脂質頭部であるから、電子密度そのものを決定できる X 線の優位性は揺るがない (但し、結晶が必要である)。従って、本研究で開発した方法の重要性は明らかであろう。

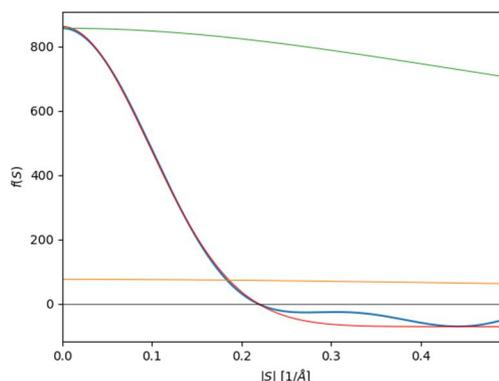


図 2. $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ クラスターが方向性を失って結合している場合の散乱振幅。横軸は分解能の逆数。青線、密度汎函数法によって計算した電子密度動径分布より得られた散乱振幅。赤線、 $s < 0.25$ での近似函数。オレンジ、 Pt^{2+} の散乱振幅。緑、 Pt^{2+} の散乱振幅を原点で Ta クラスターと同じとして規格化した場合。

②溶媒コントラスト変調法に関して、適用可能なポンプ蛋白質結晶を複数見出し、SPring-8 BL41XUにおいて回折強度データ収集を行った。また、対応可能な空間群を拡大するようにソフトウェアを改変し、低角反射の強度情報の詳細な統計を得るプログラムを開発した。また、この手法では、コントラスト変調剤 Histodenz を高濃度(可能なら 70% w/v 程度まで)添加する必要があるが、それに伴う結晶格子の変化を抑える必要がある。本研究から、コントラスト変調剤の添加は格子を広げることも狭くすることもあること、補正のために加えるべき PEG の濃度も増やすべき場合と減らすべき場合があることも判明した。結晶化のために高濃度の PEG を必要とするような結晶には溶媒コントラスト変調法は本来適用不可能であるが、本研究の結果、コントラスト変調剤を可変できる

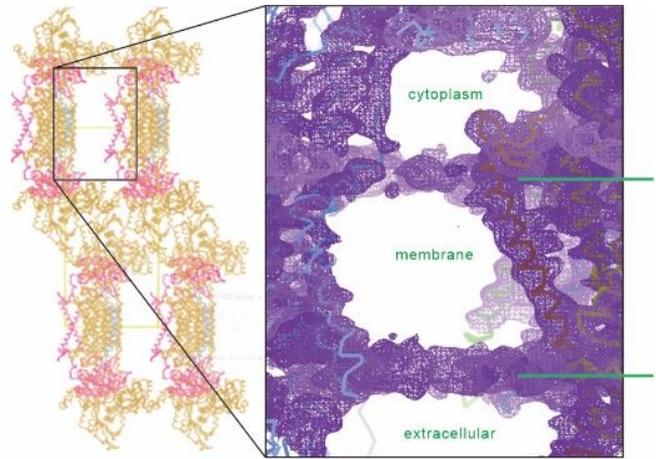


図3 . 0-70% Histodenz 溶液に結晶を浸漬して得られた回折強度データと脂質二重膜に対する一次元単純モデルを用いて得た、ナトリウムポンプ結晶の初期電子密度マップ(0.7σ)。175-4 Å 分解能の反射を利用。紐は蛋白質の原子モデル。

範囲は予想よりも広いことが判明し、まだ精密化は行えていないが、ナトリウムポンプ結晶中の膜の可視化に初めて成功した(図3)。ナトリウムポンプ結晶中の脂質二重膜にはコレステロールが大量に含まれていることが分っており、今後の解析の進展によって、カルシウムポンプとは異なる脂質二重膜 膜蛋白質相互作用が明らかになるものと期待される。

(2) 結晶の大型化に関しては、まず①カルシウムポンプ蛋白質の結晶化における相図を作成し、それに基づき巨大化実験を行なった。この結果、核が存在する場合には、結晶成長は沈殿剤(PEG)が無くても、また蛋白質濃度が非常に低くても(0.1 mg/ml 以下でも)進み、通常の結晶化条件とは大きく異なることが判明した。これは、おそらく、カルシウムポンプ結晶は界面活性剤ミセルではなく、脂質二重膜中に組み込まれた形で得られることに関係しているのであろう。得られた相図に基づいて、②種結晶を使う方法や、結晶の植え継ぎ、③結晶成長に伴って母液中の蛋白質濃度は低下するが、その蛋白質を補填する方法など種々の方法を試した。その結果、これまでの10倍程度の大きさの結晶を得ることはできたが、中性子回折には全く不十分であり、結晶性も良くなかった(図4)。また、種結晶を用いる場合、可溶性蛋白質で用いられる技術では微結晶の発生を抑えられず、蛋白質を補填する方法はひびが極端に入りやすかった。結局のところ、出発点となる蛋白質溶液量を増やす以外に有効な方法を見出すことはできなかった。

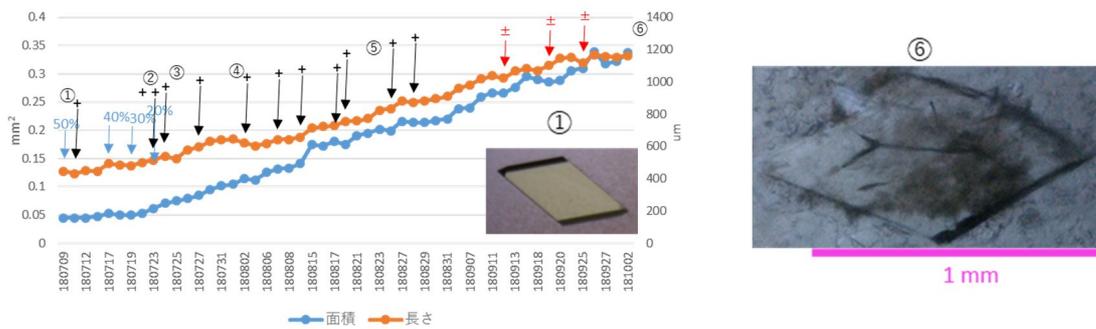


図4 .sitting drop で作製したカルシウムポンプ結晶の母液に蛋白質を追加することによって成長させた結晶の大きさの変化。横軸は観察した日時。矢印のところで蛋白質を加えている。蛋白質の追加に当たっては、まず母液の50%相当の水を加えて沈殿剤濃度を下げてから加えた。約3か月かかって結晶は大きくなったが、途中でひびが入り、結晶性は良くなかった。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kabashima Yoshiki, Ogawa Haruo, Nakajima Rie, Toyoshima Chikashi	4. 巻 117
2. 論文標題 What ATP binding does to the Ca ²⁺ pump and how nonproductive phosphoryl transfer is prevented in the absence of Ca ²⁺	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 18448 ~ 18458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2006027117	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 Kanai Ryuta, Cornelius Flemming, Ogawa Haruo, Motoyama Kanna, Vilsen Bente, Toyoshima Chikashi	4. 巻 118
2. 論文標題 Binding of cardiotonic steroids to Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase in the E2P state	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2020438118	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 該当する
1. 著者名 豊島 近, 乗松 良行	4. 巻 31
2. 論文標題 X線コントラスト変調法によって明らかになった膜蛋白質と磷脂質の相互作用のダイナミクス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射光	6. 最初と最後の頁 212-218
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanai Ryuta, Cornelius Flemming, Vilsen Bente, Toyoshima Chikashi	4. 巻 119
2. 論文標題 Cryoelectron microscopy of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase in the two E2P states with and without cardiotonic steroids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2123226119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2123226119	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 What is the activation signal for phosphoryl transfer in the calcium
3. 学会等名 Honorary Skou Professor Seminar, Aarhus University, Aarhus, Denmark (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 イオンポンプの構造生物学：脂質二重膜からプロトンまで
3. 学会等名 2019年度 iBIX-JAXA-KEK物構研-QST合同研究会「クライオEM、X線、中性子タンパク質構造解析の住み分け」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 P 型 ATPase によるイオン輸送とその制御機構
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 Role of phospholipids in ion pumping
3. 学会等名 5th ShanghaiTech-SIAIS BioForum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 原子構造に基づく筋小胞体カルシウムポンプの制御機構
3. 学会等名 日本筋学会第4会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 カルシウムポンプの結晶構造解析の現状
3. 学会等名 第2回Spring-8における蛋白質構造生物学研究の現状と将来（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 Structural Biology of the Calcium Pump
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 Structural Biology of Ion Pumps
3. 学会等名 Post Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊島 近
2. 発表標題 Structural Biology of Ion Pumps
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Chemical Communication (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

豊島研究室ホームページ https://www.iqb.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/index.html
--

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
研究分担者	恒川 直樹 (Tsunekawa Naoki) (90638800)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員 (12601)	研究期間2020.4 - 2022.3
研究分担者	秋葉 俊彦 (Akiba Toshihiko) (80291889)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員 (12601)	研究期間2018.4 - 2020.3

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