

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659016

研究課題名(和文) 膜タンパク質の構造解析用新規ナノディスクの創成

研究課題名(英文) Development of novel nano discs for structural analysis of membrane proteins

研究代表者

松崎 勝巳 (Matsuzaki, Katsumi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00201773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：脂質二分子膜と似たアシル鎖配向で膜タンパク質周囲を被い可溶化できるような新規可溶化剤の開発を行った。リン脂質ファスファチジルコリンのアシル鎖のうち1本を界面活性剤に置換した可溶化剤を合成した。膜タンパク質バクテリオロドプシンを可溶化でき、従来の界面活性剤より変性作用が少ない事がわかった。また、可溶化剤がタンパク質周囲を一層だけ覆う場合に予想される、30分子程度の少ない分子数で可溶化体を形成することがわかり、構造解析研究に有用な膜タンパク質可溶化剤の初期開発を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：New agents for solubilization of membrane proteins were designed to cover hydrophobic surface of proteins with bilayer-like orientations. A phosphatidylcholine-based solubilizing agent was synthesized by substituting one acyl chain with a detergent. The agent was found to stably solubilize bacteriorhodopsins with lower denaturing effect compared with conventional detergents. Only ~30 molecules were required for solubilization of one bacteriorhodopsin. These promising results indicate that the agent has superior properties for structural studies of membrane proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：膜蛋白質 可溶化剤

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体(GPCR)をはじめとする膜受容体やトランスポーター、イオンチャンネルなど生命機能に重要なタンパク質の多くは膜タンパク質であるが、膜タンパク質の構造研究は水溶性タンパク質に比べ大幅に遅れている。高分解能でタンパク質構造を決定できる手法としては X 線結晶構造解析と高分解能 NMR があるが、膜タンパク質の結晶化は容易ではなく、また結晶状態は必ずしも脂質二分子膜中での構造を反映しているとは限らない。一方、高分解能 NMR はタンパク質の構造及び分子ダイナミクス情報を得ることができる強力な手法であるが、測定可能な分子量は最大で 80 kDa 程度に制限される。例えば 6 回膜貫通型の大腸菌セリンプロテアーゼ GlpG は分子量が約 31 kDa であるため、分子量 50 kDa 程度以下の可溶化剤で可溶化する必要がある。小さい分子量を達成するためには、界面活性剤によるミセル化のように膜タンパク質表面を一層の両親媒性分子で覆うことで可溶化する必要がある。しかし、ミセル環境は生体膜環境とは大きく異なるため、膜タンパク質本来の構造を反映しないことが多い。正しい構造を得るには脂質二分子膜環境を持つ可溶化系が必要である。モデル膜として汎用されるリポソーム、アポリポタンパク質-脂質複合体ナノディスク構造、バイセルはいずれも表に示すようにキャリア単独で高分解能 NMR 測定が可能な分子量を超えており、ここに再構成した膜タンパク質の溶液 NMR 測定は困難である。従って現在、高分解能 NMR に適した脂質二分子膜系は存在せず、はるかに分子量の小さい新規ナノ粒子が強く求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では分子量の小さい新規ナノディスク構造を形成する可溶化剤として、典型的なグロセロリン脂質であるフォスファチジルコリンのアシル鎖(疎水基)のうちの1本を、水と疎水基の両方に親和性を持つ分子に置き換えた化合物をデザイン・合成する。この新規可溶化剤によるナノディスクの構造を各種分光法で評価する。さらに、膜タンパク質をこのナノディスクに組み込み、溶液 NMR 測定を行う。膜タンパク質を脂質二分子膜と同様の環境で可溶化を行うことができれば、分子量が小さく、高分解能溶液 NMR に適したナノディスクを創成できる。本研究が成功すれば膜タンパク質の溶液 NMR 測定にブレークスルーをもたらすことになり、その意義は大きい。

## 3. 研究の方法

【可溶化剤の合成】フォスファチジルコリンの2本のアシル鎖のうち一本を PEG で置換した新規可溶化剤(PEG-PC、分子量:784)を合成した。4-pyrrolidinopyridine 0.1 mmol、lyso-oleoil-phosphatidylcholine(lyso-PC) 0.5 mmol、dicyclohexylcarbodiimide 0.06 mmol を蛍光セル中に取り、30 分間真空乾燥した。PEG カルボン酸誘導体(mPEG4-propionic acid) 0.5 mmol を加え、さらに1時間30分真空乾燥した。その後ジクロロメタン 3 mL を入れ、35 °C で1日インキュベートした(Mason et al. Anal. Biochem. (1981)113, 96)。また、sn-2 位を cholic acid で置換した可溶化剤 cholyl-PC を合成した。Cholic acid 0.50 mmol、lyso-PC) 0.25 mmol、4-pyrrolidinopyridine 0.050 mmol、dicyclohexylcarbodiimide 0.25 mmol、を、クロロホルム 3.0 mL 中に溶解させ、アルゴン置換下で2日インキュベートし、cholyl-PC を合成した。

合成した可溶化剤は逆相 HPLC で精製しエレクトロスプレーイオン化質量分析計を用いて分子量を精製した可溶化剤は凍結乾燥し、MeOH に溶解させ-80 °C で保存した。(純度 95%以上)

【臨界ミセル濃度測定】界面活性剤溶液(終濃度 0 ~ 20  $\mu$  M)に、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)を溶解させ(終濃度 5  $\mu$  M)、分光蛍光光度計を用いて 25 °C における蛍光強度を測定した(励起波長: 358 nm、蛍光極大波長: 430 nm)。Cholyl-PC 濃度上昇に伴う蛍光強度の変化をプロットし、臨界ミセル濃度(cmc)を測定した。

【可溶化能測定】各濃度の cholyl-PC(終濃度 0.1 ~ 1.5 mM)の PBS(-)(NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.1 mM, KCl 2.68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 7.69 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4)溶液中に、バクテリオロドプシン(bR)を溶解させ(終濃度 1  $\mu$  M)、1時間インキュベートした。その後、遠心分離(20,000 g, 1時間)し、上清の吸収スペクトルを、紫外可視分光光度計にて測定した。560 nm 付近の吸収極大波長における吸光度と可溶化剤の関係性について分析した。

【蛍光相関分光法(FCS)による拡散時間測定】Tetramethylrhodamine(TMR)標識した bR (終濃度 20 nM) [6] を 0.50 mM 界面活性剤/PBS(-)溶液(C6-DHPC のみ 15.5 mM)中に可溶化させ、25 °C で1時間インキュベート

し、20,000 g で 1 時間遠心分離した後の上清を回収し、蛍光相関分光法(FCS)により 30 におけるミセルの拡散時間を測定した。

また、bR を含まない空のミセルを測定するサンプルには、lissamine rhodamine-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(rhodamine-DOPE)(終濃度 20 nM)を添加し、拡散時間を測定した。また、Rhodamine B (30 での拡散係数=4.84  $\mu\text{m}^2/\text{sec}$  [7]) を用いて、ピンホール径 S におけるコンフォーカルボリュームを測定した(半径= 0.287  $\mu\text{m}$ , 高さ/半径= 5.56)。

#### 4 . 研究成果

少量合成した PEG-PC は水や緩衝液 ( PBS ) に分散し、約 4  $\mu\text{M}$  の cmc を持つ事を確認した。蛍光標識した膜貫通ヘリックス(AALALAA)<sub>3</sub>の蛍光スペクトルから可溶化能を評価したが、原料の lyso-PC と比較して、可溶化能が大幅に減少することが判明した。そこで、置換する両親性分子を変更し、フォスファチジルコリンの 2 本のアシル鎖のうち一本を 2 本のアシル鎖の内、sn-2 位を cholic acid で置換した可溶化剤 cholyl-PC を合成した。Cholic acid は rigid な骨格および親水面・疎水面を持つため、疎水面でアシル鎖と相互作用できると考えられる。合成した cholyl-PC の cmc は 2  $\mu\text{M}$  であることが分かったため、可溶化能の検討に進んだ。

各濃度の cholyl-PC 溶液中に bR を溶解させた所、cholyl-PC 濃度 0.5 mM において、bR の吸光度がプラトーに達した。よって、他の界面活性剤と比較する場合に、CMC が 0.5 mM を上回っている場合を除き、全て bR の可溶化を 0.5 mM で行うこととした。膜タンパク質の可溶化によく用いられる界面活性剤や、cholyl-PC の原料となる lyso-PC を用いて、bR の可溶化能を比較した ( cholyl-PC: 0.5 mM, TritonX-100: 0.5 mM, DDM: 0.5 mM, C6-DHPC: 15.5 mM, lyso-PC: 0.5 mM )。Cholyl-PC は DDM や TritonX-100 と同程度の可溶化能を持つ事が分かった。bR が 3 次構造を保っている時、内部に含まれるレチナールによって 560 nm 付近に吸収を示す。一方、bR が 3 次構造を保っていない時、遊離したレチナールの吸収が 380 nm 付近に現れる。これらを利用して、cholyl-PC や、膜タンパク質の可溶化によく用いられる界面活性剤 (TritonX-100, n-dodecyl-D-maltoside(DDM), C6-DHPC, lyso-PC)中の bR の吸収スペクトルを測定し、bR の熱安定性に与える影響を

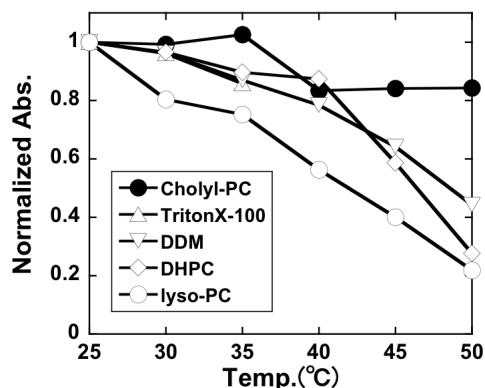


図 1 Cholyl-PC および各界面活性剤に溶解させた bR の熱安定性

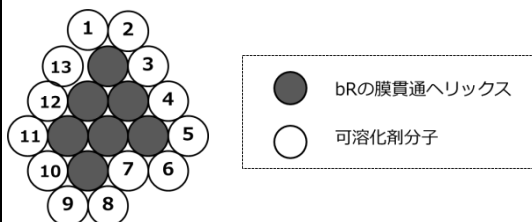


図 2 ヘキサゴナル格子モデル

比較した ( 図 1 )。25 ~50 において、界面活性剤中でインキュベートした bR の吸収スペクトルの 560 nm 付近の最大吸光度をプロットした。TritonX-100 中では、40 以上で強い散乱が見られ、可溶化には適さなかった。一方で、cholyl-PC 中では温度が 40 を超えても 560 nm 付近の吸収が保たれていることから、温度が上昇しても bR の構造を維持していることが分かる。これは、cholyl-PC がより安定に bR を可溶化していることを示唆している。bR を cholyl-PC (0.5 mM)、中に可溶化させ、40 でインキュベートし、吸収スペクトルの経時変化を測定した。12 時間経過以降では短波長側に強い散乱が見られ、bR または可溶化剤の凝集が考えられる。

TMR ラベル化 bR を界面活性剤 (cholyl-PC、TritonX-100、DHPC) で可溶化し、FCS により拡散時間を測定した。( cholyl-PC/ cholyl-PA: 0.3 mM/ 0.2 mM, cholyl-PC: 0.5 mM, TritonX-100: 0.5 mM, C6-DHPC: 15.5 mM ) 測定された拡散時間からミセルの分子量を算出すると、C6-DHPC < cholyl-PC < TritonX-100 となり、cholyl-PC によるミセルは比較的小さなサイズで bR を可溶化出

来ることが分かった。

また cholyl-PC 中において、bR の周囲に存在する界面活性剤分子数は約 36 分子であった。この分子数は、bR の周囲を界面活性剤分子(約 26 分子)が取り囲んだディスク形状で予想される会合数に近い(図 2)。

以上の結果から cholyl-PC は、従来の界面活性剤より安定かつ小さな分子量で膜タンパク質を可溶化することが出来る事が明らかになった。今後より凝集しにくいよう電荷を持った可溶化剤を合成・可溶化能を評価し、高分解能 NMR を用いた膜タンパク質構造解析へ適用を検討する。

## 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)

[学会発表](計 1 件)

林田幸一、茂木雄三、山岡庸介、高須清誠、矢野義明、松崎勝巳「膜タンパク質変成作用の少ない可溶化剤の開発」日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 27-30 日(横浜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松崎 勝巳 (MATSUZAKI, Katsumi)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00201773

### (2)研究分担者

矢野義明 (YANO, Yoshiaki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：60402799

星野 大 (HOSHINO, Masaru)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：70304053