

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282235

研究課題名(和文) 膜タンパク質挿入において新規糖脂質が示す酵素様活性の作用機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of Mechanisms on Membrane Protein Integration by a Glycolipid Acting Like an Enzyme

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・その他部局等・その他

研究者番号：70235638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：MPlase (Membrane Protein Integrase)は大腸菌内膜より単離された3種のアミノ糖ユニットが繰り返す糖鎖、ジアシルグリセロール、ピロリン酸から成る糖脂質で、膜タンパク質膜挿入に関わる酵素様活性を示す。本研究では、糖鎖部のO-アセチル基とリン酸基の重要性を明らかにした。NMRを用いた解析により、MPlaseの糖鎖のアセチル基が基質タンパクと相互作用することを明らかにした。糖鎖が疎水性タンパクの凝集を抑制することで、膜挿入を可能にすると考えられる。また、糖鎖長やアセチル基の数が均一な部分構造を用いて最小活性構造を明らかにするために、基本となる3糖ユニットを合成した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported an integration factor in the inner membrane of *E. coli*, named MPlase (membrane protein integrase) is a glycolipid composed of diacylglycerol and a glycan chain of three acetylated aminosugars linked through pyrophosphate. MPlase is essential for membrane protein integration and acts like an enzyme. In this study, we showed that O-acetyl groups in the glycan and a phosphate group are required for its activity. NMR experiments indicated the interaction between the acetyl groups of MPlase and the substrate peptide. Based on these results, we propose a plausible mode of action, in which a glycan chain of MPlase captures a substrate to prevent aggregation. Moreover, we synthesized a trisaccharide unit of MPlase to reveal a minimum active structure.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖脂質 膜挿入 膜タンパク質 糖鎖合成 生体膜

### 1. 研究開始当初の背景

生命の基本単位であるすべての細胞は細胞膜で包まれており、生命維持に重要なタンパク質の多くが、細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質の形で存在している。膜タンパク質が機能をもつためには、正しい三次元構造をもって膜に挿入される必要がある。タンパク質の膜挿入は、大腸菌のような原核生物とヒトや植物などの真核生物とで共通の機構があると考えられており、トランスロコンと呼ばれる特別な分子装置に依存する過程と非依存的に挿入される過程が知られている。最近、岩手大学西山(本課題の連携研究者)は、リポソーム上に既存のトランスロコンを再構成しても膜挿入が再現できないが、大腸菌内膜(細胞膜)の抽出物を加えることで挿入活性が復元されることを見出した<sup>1)</sup>。彼らは、トランスロコン依存性の有無に関わらず、膜挿入には Membrane Protein Integrase (MPIase) と名付けた新因子が必須であることを明らかにしたが、因子の実態は不明であった。

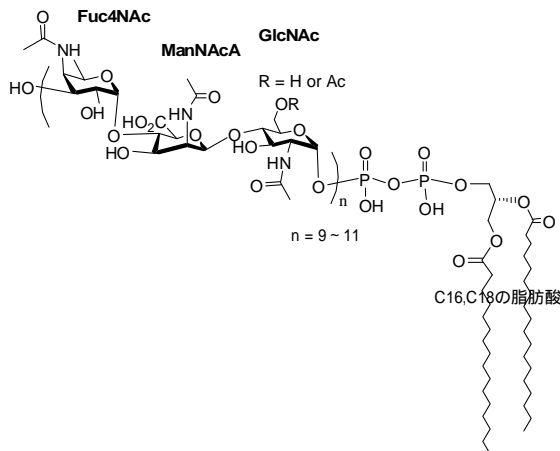


図1 MPIase の構造

我々は西山と共に、膜タンパク質挿入活性を指標として、各種分配法や HPLC を用いて大腸菌内膜から MPIase を精製した。その結果、驚いたことに MPIase はタンパク質ではないことが明らかになった<sup>2)</sup>。さらに、有機化学的手法で構造決定したところ、MPIase は *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、*N*-アセチルマンノサミンウロン酸(ManNAcA)、4-*N*-アセチルアミノフコサミン(Fuc4NAc)の3種のアミノ糖の繰り返しから成る糖鎖とリン脂質で構成される新規の糖脂質であることがわかった(図1)。糖脂質にこのような酵素様活性がある例はこれまでにない。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の2点を実施し、生命維持に不可欠な膜タンパク質挿入機構の理解と、非タンパク質性の糖脂質がシャペロン・酵素様のはたらきをするという新しい概念の確立を目標とした。

(1) MPIase の機能部分と脂質膜や挿入され

るタンパク質との相互作用を解析し、MPIase が膜挿入にどのように関与するのかを明らかにする。

(2) MPIase の生合成経路を明らかにし、基質誘導体や阻害剤を供給することで、天然物や類縁体合成を制御する。

### 3. 研究の方法

(1) MPIase の機能部分と脂質膜や基質タンパク質との相互作用解析には主として NMR を利用した。

(2) 活性最小構造を明らかにするとともに、誘導体を得るために、部分構造を合成した。

### 4. 研究成果

#### (1) MPIase の活性機構の解析

##### MPIase の構造活性相関

ピロリン酸切断酵素や酢酸、冷 NaOH、48% HF 水等の処理により、糖鎖誘導体を調製して活性を測定した結果、脂質部は必須ではないこと、リン酸が少なくとも1つは必要であること、糖鎖の *O*-アセチル基が必要であることが明らかになった。

##### MPIase の会合状態の解析

ピロリン酸切断酵素により脂質部を除去した誘導体(PP-MPIase)のゲルろ過を行ったところ、PP-MPIase 自身は8分子程度が会合した分子量に相当する位置で溶出された。しかし、DOSY-NMR 法で拡散係数を測定して会合状態の解析を試みたところ、MPIase は脂質部の疎水性のために会合するのに対して、PP-MPIase や酢酸処理した糖鎖誘導体は会合していないという結果になった。基質タンパク質やイオン存在下での会合状態について、詳細に調べる必要がある。

##### MPIase と基質タンパク質との相互作用

我々はゲルろ過において、PP-MPIase が基質タンパク質(3L-Pf3 coat)の凝集を抑制し、低分子画分へと移動させる現象を観測している。今回、STD(飽和移動差)-NMR において、MPIase 糖鎖部と 3L-Pf3 coat との相互作用を確認した。

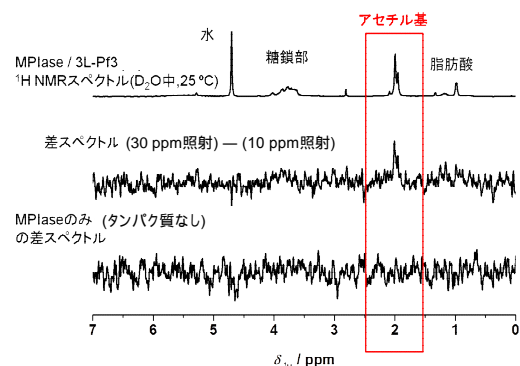


図2 STD-NMR による相互作用部位の検証

3L-Pf3 coat は膜挿入研究によく使われる47 残基のタンパク質であり、化学合成により調製して用いた。タンパク質の領域(10 ppm)を照射した場合と領域外(30 ppm)を照射した場合を比較した結果、差スペクトル上にMPlase のアセチル基のシグナルが観測された。タンパクが存在しない場合には、このような差スペクトルは観測されなかった。この結果から、MPlase のアセチル基がタンパク質と相互作用していることが立証された。これは構造活性相関の結果とも一致する。

### MPlase と膜との相互作用

膜上での MPlase の挙動を調べるために、大腸菌を [U-<sup>13</sup>C]Glucose 存在下で培養して [U-<sup>13</sup>C]MPlase を調製し、これを含むリポソームの <sup>13</sup>C CP MAS と DD MAS を測定した(図 3)。

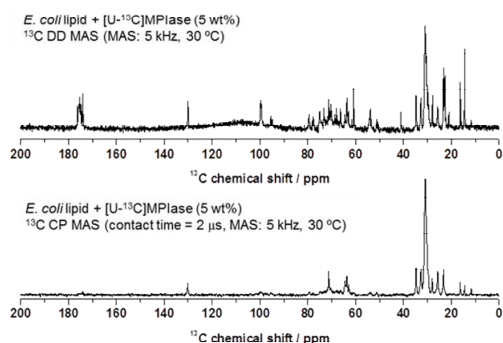


図 3 MPlase の <sup>13</sup>C-NMR

(上)DD-MAS : 全ての <sup>13</sup>C を観測  
(下)CP-MAS : 運動性が低い <sup>13</sup>C のみを観測

DD MAS は全ての <sup>13</sup>C が観測できるのに対し、CP MAS で動きが遅い <sup>13</sup>C だけが観測できるため、運動性を見積もることができる。DD MAS で観測された糖鎖由来のシグナルが CP MAS では消失し、リポソーム脂質のみが観測されたことから、糖鎖部分の運動性は高いことがわかった。糖鎖は膜表面に吸着しているわけではなさそうである。

### 推定活性機構

我々は別途の研究にて、ジアシルグリセロールにより低下した膜の運動性を MPlase が回復させる現象を観測しており、MPlase の糖鎖部がタンパク質を補足して、柔らかくなった膜に挿入する機構を推定した。

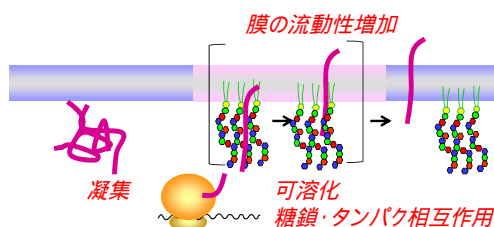


図 4 推定活性機構

### (2) MPlase 部分構造の合成

#### 基本構造の合成

機構を詳細に調べるためには、MPlase の誘導体化が必要であるが、微量の膜成分であるため天然から十分量を得ることは難しく、また糖鎖長やアセチル基の数が不均一であるために、比較検討が困難である。そこで、最小活性構造を明らかにするとともに、ウロン酸やリン酸部の類縁体を得るために部分構造の合成を検討した。

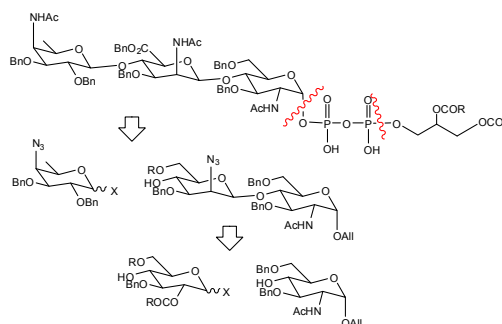


図 5 基本構造の合成戦略

まず、基本の 3 糖ユニットの合成を行った。最終段階で温和な水素添加で脱保護できるように、保護基にはベンジル基を用いた。マンノサミンウロン酸の グリコシド結合を得るために、まず 2 位をアシル基で保護したグルコースと *N*-アセチルグルコサミン誘導体を、隣接基関与を利用して 選択的に縮合した後に、2 位水酸基を立体反転を伴ってアジド基に変換した。この 2 糖を保護 4-アジドフコースと縮合した後、マンノサミンの 6 位を酸化して基本の 3 糖骨格を得た。この 1 位をリン酸化し、ホスファチジン酸と縮合することで、目的の 3 糖のピロリン脂質縮合体を得た。同様の方法で、ウロン酸部をアルコールやエステルとした誘導体、ピロリン酸をモノリン酸とした誘導体等の合成を進めている。これらは膜挿入活性測定や固体 NMR 測定に供する予定である。

#### 生合成中間体の合成

生合成酵素同定のため、ホスファチジン酸の脂質部を重水素標識した基質候補化合物を合成し、質量分析による同定を進めている。

### (3) 今後の課題

本研究により、糖鎖部の *O*-アセチル基とリン酸基の重要性が明らかになった。しかし、これらの官能基がどのように基質タンパク質と相互作用するのかは、まだ不明である。今後は均一な合成糖鎖を用いて、精密に解析していく必要がある。そのために、グルコサミンの *O*-アセチル基を有し、糖鎖を伸長できるような合成に着手している。類縁体を含めた構造活性相関研究から、各々の官能基の役割を明らかにしたい。

また、糖鎖の会合状態については、蛍光等を用いて検討する必要がある。溶液だけでなく、膜上での会合状態の解析が課題となる。

<引用文献>

K. Nishiyama et al., A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 733-736. (2010)

K. Nishiyama et al., MPlase as a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nature Commun.* **3**: 1260. (2012)

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6件)

K. Shimamoto, Elucidation of excitatory neurotransmission and membrane protein integration mechanisms *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **89**, 282-295 (2016) (査読有)

DOI:10.1246/bcsj.20150336

M. Tera, T. Hirokawa, S. Okabe, K. Sugahara, H. Seimiya, K. Shimamoto, Design and synthesis of a berberine dimer: A fluorescent ligand with high affinity towards G-quadruplexes. *Chem. Eur. J.* **21**, 14519-14528 (2015) (査読有)

DOI: 10.1002/chem.201501693

西山賢一、島本啓子 “糖脂質酵素 (Glycolipozyme) MPlase の構造と作用機作” *酵素工学ニュース* **74**, 13-17 (2015) (査読有)

[http://www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content\\_id=79](http://www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content_id=79)

K. Nishiyama, K. Shimamoto, Glycolipozyme membrane protein integrase (MPlase): recent data. *Biomolecular concepts*, **5**, 429-438 (2014) (査読有)

DOI: 10.1515/bmc-2014-0030

K. Nomura, E. Harada, K. Sugase, K. Shimamoto, Solid-state NMR spectra of lipid-anchored proteins under magic angle spinning. *J Phys Chem B.* **118**, 2405-2413 (2014) (査読有)

DOI: 10.1021/jp4124106

島本啓子、西山賢一 膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質酵素 MPlase *生命化学研究レター*, **44**, 9-12 (2014) (査読無)

[http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/FBCmember/FBC\\_NewsLetterNo44.pdf](http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/FBCmember/FBC_NewsLetterNo44.pdf)

[学会発表](計18件)

K. Nomura, E. Harada, K. Sugase, K. Shimamoto, F. Hayashi, and K. Morigaki, Solid-state NMR and Microscopic Studies of Synthetic Mimic of GPI-anchored Proteins. PACIFICHEM 2015, Self-organization of membrane systems

(#259), 2015年12月15-20日、ホノルル(アメリカ)

K. Shimamoto, T. Yamaguchi, M. Maeda, R. Nagase, K. Nishiyama Structure and function of MPlase, a glycolipid essential for membrane protein integration ECBS & ICBS joint meeting 2015, 2015年11月7-9日、ベルリン(ドイツ)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 MPlase 新学術領域ケミカルバイオロジー東北地区ミニシンポジウム 2015年6月30日、東北大学(仙台)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 創薬懇話会 2015年7月2日、グランドエクスピア鳴門(徳島)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 MPlase 徳島大学薬学部講演会 2015年4月22日、徳島大学(徳島)

山口敏幸、西山賢一、島本啓子 NMR測定による糖脂質 MPlase の膜タンパク質膜挿入作用機構解析 日本化学会第95春季年会 2015年3月26-29日 日本大学(船橋)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 有機合成化学協会関西支部セミナー 2015年2月3-4日、大阪科学技術センター(大阪)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 筑波大学天然物化学特別セミナー 2015年1月8日、筑波大学(筑波)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 農芸化学会中部支部例会 2014年10月11日、名古屋大学(名古屋)

山口敏幸、西山賢一、前田将秀、永瀬良平、楠本正一、島本啓子 膜タンパク質膜挿入活性を示すグライコリポザイムの作用機構解析 第8回バイオ関連化学シンポジウム 2014年9月11-13日 岡山大学(岡山)

山口敏幸、西山賢一、前田将秀、永瀬良平、楠本正一、島本啓子 膜タンパク質膜挿入活性を示すグライコリポザイムの作用機構解析 日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会 2014年6月11-13日 大阪大学(豊中)

島本啓子 興奮性神経伝達機構ならびに膜タンパク質挿入機構の生物有機化学的研究 日本化学会第94春季年会 2014年3月27-30日、名古屋大学(名古屋)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質 東海大学糖鎖研究所セミナー 2014年2月21日、東海大学(平塚)

野村薫、原田英里紗、菅瀬謙二、島本啓子 GPI アンカータンパク質模倣分子の脂質二重膜存在下での固体NMR測定 第52回NMR討論会 2013年11月12-14日(金沢)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵を握る Glycolipozyme 東京農工大セミナー 2013年7月25日、東京農工大(小金井)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵

を握る Glycolipozyme 理研シンポジウム  
第 8 回有機合成化学のフロンティア 2013  
年 7 月 5 日、理化学研究所(和光)

島本啓子 大腸菌膜タンパク質挿入の鍵  
を握る糖脂質 第 14 回関西グライコサイ  
エンスフォーラム 2013 年 5 月 25 日、大  
阪大学(豊中)

野村薫、原田英里紗、菅瀬謙二、島本啓子  
GPI アンカータンパク質模倣分子の脂質二  
重膜存在下での固体 NMR 測定 日本膜学会  
第 35 年会 2013 年 5 月 20 - 21 日、早稲田  
大学(東京)

〔図書〕(計 1 件)

島本啓子、西山賢一 タンパク質ではない酵  
素? 実験医学増刊号(羊土社)35, 155-122  
(2014) (査読無)

〔その他〕

ホームページ等

(公益財団法人)サントリー生命科学財団 HP  
<http://www.sunbor.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 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・主幹研究員  
研究者番号: 70235638

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

三浦(野村) 薫 (MIURA(Nomura), Kaoru)  
(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・研究員  
研究者番号: 90353515

西山 賢一 (NISHIYAMA, Ken-ichi)

岩手大学農学部・教授

研究者番号: 80291334

村田 道雄 (MURATA, Michio)

大阪大学大学院理学研究科・教授

研究者番号: 40183652