

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：74408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620137

研究課題名(和文) 膜タンパク質挿入活性をもつ新規糖脂質の脂質膜上での局在と膜に及ぼす作用の解明

研究課題名(英文) Mechanism Analysis of Interaction between Membrane and a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MPlase (Membrane Protein Integrase)は3種のアミノ糖から成る糖鎖とジアシルグリセロール(DAG)がピロリン酸を介して繋がった新規の糖脂質で、大腸菌内膜より単離された膜タンパク質膜挿入に関わる新因子である。従来、単純なタンパク質は疎水性によって自発的に膜挿入すると考えられてきた。しかし我々は、生理的濃度のDAGが膜挿入を阻害し、MPlaseが復活させる現象を見出した。大腸菌リン脂質の膜試料の固体NMRを測定した結果、DAGおよびMPlaseにより膜の相状態は変化しないこと、膜中の脂質の運動性はDAGによって低下し、MPlaseによって上昇することがわかった。

研究成果の概要(英文)：MPlase (Membrane Protein Integrase) is a glycolipid composed of diacylglycerol and a glycan chain of three acetylated aminosugars linked through pyrophosphate, and is essential for membrane protein integration. It is found that a physiological concentration of diacylglycerol (DAG) blocks the integration of proteins into membranes, whereas MPlase restores the integration. In this study, we characterized membranes composed of *E. coli* phospholipids in the presence and absence of DAG/MPlase by solid-state NMR experiments. We revealed that neither DAG nor MPlase changes lipid polymorphic phase and that DAG decreases the mobility of lipids while MPlase increases it. Based on these results, we deduced the mechanism of membrane protein integration by MPlase.

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 生体膜 糖鎖 固体NMR

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質を正しい高次構造で膜に挿入する機構は生命にとって重要な意味をもつ。最近、我々は大腸菌の内膜から、新規の膜挿入因子 MPlase (Membrane Protein Integrase) を見出した (図 1)。MPlase 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 糖ユニットが 10 回程度繰り返した糖鎖とジアシルグリセロール (DAG) がピロリン酸を介して繋がった新規の糖脂質であった。MPlase はタンパク質性の部分構造を持たない糖脂質であるにもかかわらず、膜タンパク質が膜に挿入する際にシャペロン・酵素様の重要な役割を果たすことから、Glycolipozyme という概念の提出に至っている¹⁾。

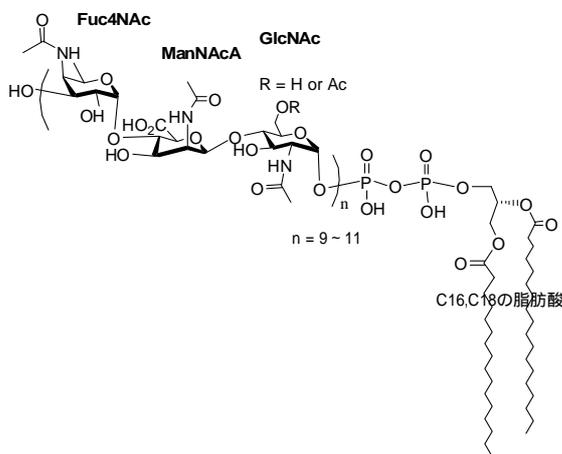


図 1 MPlase の構造

さらに、脂質部が欠如した MPlase の糖鎖部分がタンパク質を可溶化することを示したが、脂質部を有する MPlase が膜上でどのようなはたらきをしているのかは不明のままであった。

2. 研究の目的

我々は、MPlase が会合して膜上に局在し、基質タンパク質の構造変化を起こしたり、膜の性質を変えたりすることで、挿入を引き起こしているのではないかと考えた。本研究では、膜上での MPlase の局在・会合様式や MPlase 存在時の膜の形態・流動性の変化を解析することとした。これにより、原核生物の生体膜における膜タンパク質挿入機構の詳細と、糖脂質がシャペロン・酵素様活性を示す活性要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

膜タンパク質挿入過程には、トランスロコン (タンパク質性のチャネル複合体) に依存する経路と非依存性経路が知られている。従来、ファージコートタンパク質 3L-Pf3 coat のような単純な構造のタンパク質はトランスロコン非依存性で、タンパク合成に伴って、

膜の脂溶性によって勝手に挿入されていく「自発的挿入」であると考えられていた (図 2a)。しかし、連携研究者の (岩手大) 西山らは生理学的濃度 (2~5%) のジアシルグリセロール (DAG) が「自発的挿入」を抑制し、トランスロコン非依存性タンパク質でも挿入が起こらなくなることを見出した (図 2b)。

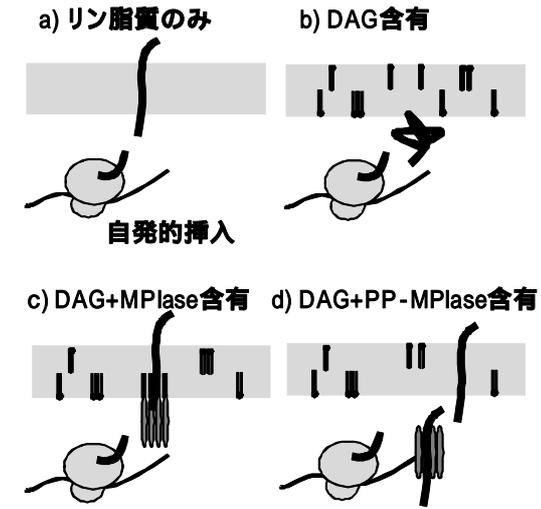


図 2 リポソーム膜に添加する脂質分子が膜タンパク質挿入に及ぼす効果

一方、DAG 添加により自発的挿入を抑制した状態のリポソームに、0.5% 程度の MPlase を加えると挿入が復活する (図 2c)²⁾。MPlase の脂質部を除去した糖鎖部分 (PP-MPlase) のみをリポソーム作成後に加えても活性が見られる (図 2d)。これらの結果は、3L-Pf3 coat の生体膜への挿入も自発挿入ではなく、DAG や MPlase によって制御されていることを示唆する。我々は、これらの効果はおそらく膜の流動性や膜構造の変化によるものであると推定した。そこで、固体 NMR により DAG と MPlase の効果を検証することとした。

4. 研究成果

(1) 膜の相状態の解析

固体 NMR では ³¹P-NMR のピーク線形により膜の形状を推定できる。大腸菌由来のリン脂質に DAG や MPlase を加えて構成した MLV (Multi-lamellar vesicle) の固体 NMR を測定し、その線形の変化から、膜の形状を調べた。

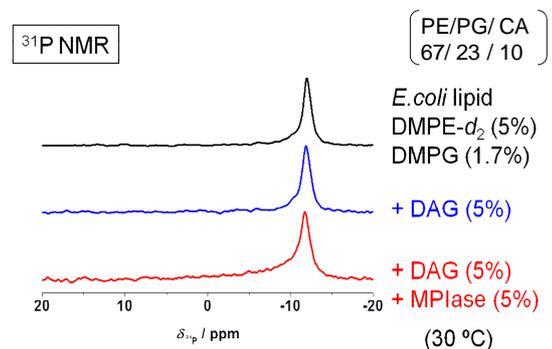


図 3 ³¹P-NMR による膜の形態の観測

その結果、いずれの場合も-10 ppm 付近にピークがあり、二重膜構造は維持されていることが確認できた(図3)。すなわち、DAGによる挿入阻害は相状態の破壊によるものではないことが分かった。

(2) 膜の流動性の解析

リポソームの重水素固体 NMR は、Pake-Doublet と呼ばれる形状を示し、その四極子分裂幅()は運動性が大きくなるほど小さな値を示すことが知られている。大腸菌膜の主成分であるホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)および DAG の脂肪酸部に重水素を導入し、各々の膜脂質の四極子分裂幅を測定した。

重水素標識膜脂質の合成

重メタノール中で塩基と反応させることでラウリン酸(C12)の 位を重水素化した。カルボン酸をアルデヒドとした後、Horner-Wadsworth-Emmons 反応で増炭し、二重結合を水素添加することで4位が重水素化されたミリスチン酸を得た。これを縮合させて、重水素標識 DAG, PE, PG を合成した(図4)。

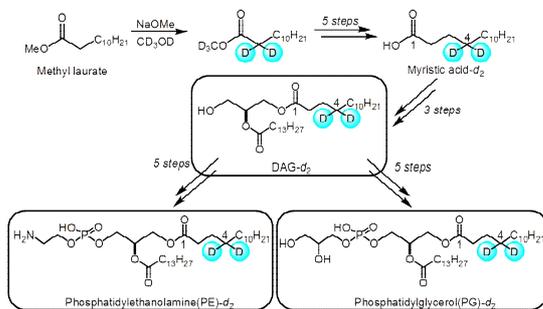


図4 重水素標識膜脂質の合成

重水素固体 NMR の測定

大腸菌脂質リポソームを調製し static ^2H NMR 測定を行ったところ、 ^{31}P NMR と同様に、いずれの試料も一軸回転パターンではなく配向パターンを示した(図5)。測定温度 40°C では、脂質のみの膜中での ^2H 標識 PE の ^2H NMR の四極子分裂幅は 28.3 Hz、DAG 含有膜中では 29.0 Hz であり、DAG によって PE の運動性が低下することがわかった(図5a)。ここに MPIase を添加すると、四極子分裂幅は 28.5 Hz と脂質膜中と同程度になった。すなわち MPIase によって、PE の運動性は脂質のみ膜中と同程度まで上昇した。同様に、PG も DAG によって運動性が低下し、MPIase によって運動性が上昇した(図5b)。また、DAG も MPIase によって運動性が上昇した(図5c)。すなわち、DAG によって膜全体の流動性が低下し、MPIase によって流動性が上昇した。このような膜の流動性の変化が DAG による膜挿入阻害、MPIase による膜挿入の復活の一因となっていると考えられる。DAG や MPIase 添加による

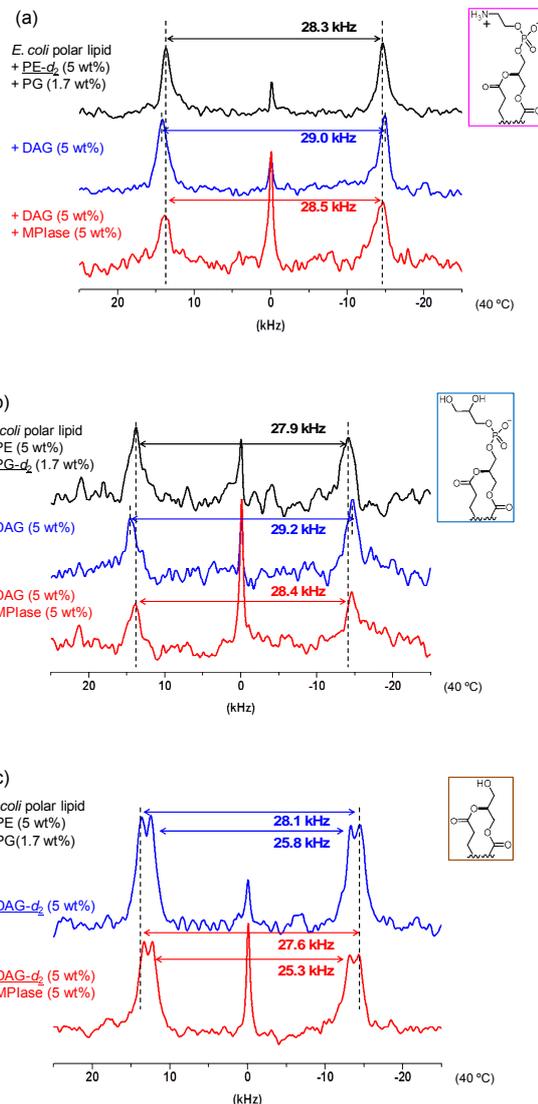


図5 大腸菌脂質膜の ^2H NMR

(a)標識 PE の四極子分裂 (b)標識 PE の四極子分裂 (c)標識 DAG の四極子分裂

四極子分裂幅変化の値はわずかだが、温度依存の結果から、数分の変化に相当することが分かる(図6)。大腸菌にとっては意味のある変化であると推定される。

測定温度 30°C では、PE は 40°C の時と同様に、DAG によって運動性が低下し、MPIase によって元に戻った。一方、PG では、DAG によって運動性が低下したが、MPIase の添加では運動性に変化がなかった。DAG は MPIase によって運動性が上昇した。温度依存性を測定したところ、このような挙動の違いは、温度が低いほど顕著であった。以上より、MPIase に対する PE と PG の相互作用が異なることが考えられる。

MPIase はピロリン酸部および糖鎖部 ManNAcA に負電荷を持つ。PE は頭部に正電荷と負電荷を持つが、PG は負電荷のみを持つ。加えて、MPIase の頭部は巨大であるため、膜脂質の種類によって、頭部との相互作用様式が異なってくるのであろう。

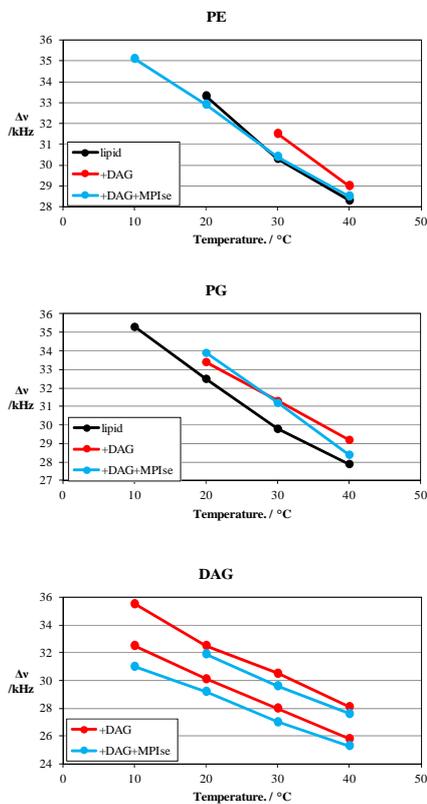


図6 四極子分裂幅の温度依存性

リン酸部と MPIase との相互作用

膜脂質のリン酸部の運動性を調べるために ^{31}P の緩和時間を測定した。脂質部の場合とは異なり、DAG の添加はほとんど影響を与えなかったが、MPIase を添加することで著しい膜脂質頭部（リン酸部）の運動性の上昇がみられた。DAG や MPIase の運動性変化への寄与は、頭部と脂質部では異なっていることが分かる。

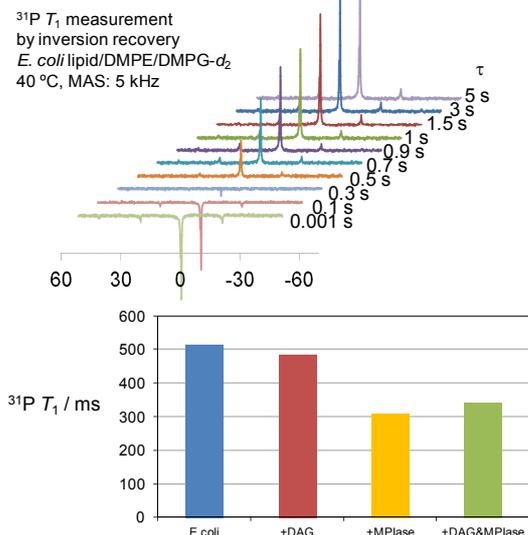


図7 (上) 膜脂質リン酸部の ^{31}P 縦緩和時間の測定。(下) 膜脂質リン酸部の ^{31}P 縦緩和時間に対する DAG や MPIase の影響

(3) 今後の課題

本研究により、DAG により膜の流動性が低下し、MPIase により流動性が復活していることが明らかになった。また膜表面のリン酸部の状態も変化している。生体内で膜の特定の位置にタンパクを導入するためには、MPIase による膜物性の変化が重要な役割を果たしていると考えられる。今後は、膜の MPIase が膜の運動性を上昇させる要因が負電荷にあるか、頭部の大きさにあるかを調べるために、部分構造を合成し、その構造活性相関を調べる予定である。

<引用文献>

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

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)

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) MPIase 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

K. Nishiyama, K. Shimamoto, Glycolipozyme membrane protein integrase (MPIase): 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

[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ボ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ボ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