

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650051

研究課題名(和文)重原子標識脂質を導入した膜タンパク質構造解析技術の開発

研究課題名(英文)Development of membrane protein structure analysis using heavy atom labeled lipids

研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA, SHIGERU)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：90615428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の機能発現には周辺脂質が必要不可欠であり、周辺脂質の構造と機能の解明も重要である。膜タンパク質の結晶化は、膜脂質を除去し界面活性剤で膜タンパク質を可溶化させる方法が一般的であるが、膜タンパク質の不活性化が問題となる。本研究では、より生体膜に近いバイセルに着目し、モデル膜タンパク質としてバクテリオロドプシン(bR)を用いた。その結果、臭素をアシル鎖末端に導入した新規Br-DMPCバイセルを用いた結晶化に初めて成功し、従来法では不明瞭であったbR周辺に存在する脂質の構造を決めることができた。さらに異なる脂質を取り入れた新規バイセルにおいてもbR結晶化に成功した。

研究成果の概要(英文)：The specific lipids binding to membrane protein play a crucial role in membrane protein organization and function, resulting in a very important to elucidate the detailed mechanism of its specific lipid recognition. Membrane protein is crystallized after solubilization by detergents, although this treatment often disrupts innate structures and functions. Here we focused on crystallization of bacteriorhodopsin (bR) using various lipid bicelles as membrane mimicking systems. Bicells are small bilayer disks that form in lipid / amphiphile mixtures. Eight lipid bicelles were crystallized by mixing bR, resulting successfully in formation of bR-bicelle crystals. X-ray crystal structure analyses indicated that heavy atom labeled lipids are successfully incorporated into the bR-bicelle crystal, successfully interacting with bR. Our bicelle crystallization technique may be applicable for structurally unknown membrane proteins.

研究分野：生物学

キーワード：構造生物学 膜タンパク質結晶 バイセル 重原子標識脂質 結晶成長 重原子誘導体結晶 膜脂質 異常分散

1. 研究開始当初の背景

脂質二重膜の機能を理解するには、細胞表面付近での脂質とタンパク質の相互作用解明が極めて重要となる。脂質は、生命の維持活動に必須の生体膜の構成成分というだけでなく、ダイナミックに変化して膜タンパク質の機能発現に重要な役割を果たすほか、代謝されてシグナル伝達の機能も発揮する。また脂質と相互作用するタンパク質の構造-機能相関に関する研究においては、一部では素晴らしい成果が得られているものの、特に膜タンパク質については、従来からタンパク質安定化のために界面活性剤が用いられ、本来の構造を維持しないまま線構造解析のための結晶化が行われてきている。しかし、その結晶化の成功率は極めて低く、細胞膜中の活性状態の再現性等、解決すべき課題は多い。従って、脂質とタンパク質の相互作用解明のためには、細胞中での活性を維持したまま、タンパク質を安定化し高品質結晶を得る技術の創出が待望されている。このような背景において10年程前に、脂質 DMPC と界面活性剤 CHAPSO を混合して作製できる脂質二重膜モデルのバイセル(図1)が、活性を保ったままの状態での膜タンパク質を結晶化させる試みがなされた。その結果、バイセルを用いた膜タンパク質の結晶化は成功し、界面活性剤に代わる安定化剤と成り得る可能性が示された。しかし、その適用例は現在までに5例と極めて少ない。

申請者は JST CREST 「タンパク質完全結晶創成」(代表:大阪大学工学研究科 森勇介)において、結晶成長は静置状態が理想である、という従来の常識とは逆の発想で「溶液攪拌」による高品質結晶化という独自技術の開発を進めてきた。この技術は膜タンパク質 AcrB にも応用され、分解能 3.5 Å が限界だった結晶を 2.3 Å 分解能まで向上させることに成功した。そこで申請者は、バイセル結晶化法と溶液攪拌法との組み合わせによる膜タンパク質の高品質結晶化技術を開発するという新たな着想によって上記の課題を克服しようと考えた。

一方、新規膜タンパク質の構造解析をおこなう場合は位相決定が問題となる。位相決定には、一般に重原子を含んだ結晶を調製する必要があるが、結晶化が容易でない膜タンパク質では、重原子の影響をうけて結晶の品質がさらに低下することが多い。そこで本研究では、重原子標識脂質をあらかじめ導入したバイセルを用いて膜タンパク質の結晶化を検討した。これにより重原子標識化合物が膜タンパク質に結合した状態の共結晶が得られれば、構造の安定化と同時に、導入した重

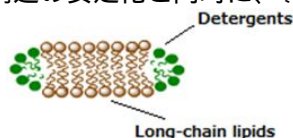


図1 バイセル

原子が位相決定の手がかりになると期待される。

2. 研究の目的

バクテリオロドプシンは、最も研究されている膜タンパク質の1つであり、バイセル結晶化が最初に成功した膜タンパク質でもある。本研究では、既に結晶化報告例のある bR をモデル膜タンパク質として、次の2つの項目の研究開発を行うことにした。

膜タンパク質に最適な脂質を選択する新規バイセル結晶化法と独自結晶化技術である溶液攪拌法との組み合わせによる高品質結晶化技術を開発する。

膜タンパク質と相互作用している脂質の重原子標識化に取り組み、これを用いた重原子誘導体結晶の調整法を確立する。

本技術は、新しい脂質によって作製した脂質二重膜構造を有する新規バイセルと独自技術の溶液攪拌法を組み合わせることによって、高品質な膜タンパク質結晶を育成する技術を確立することを目指す。さらに重原子で標識化した脂質により作製したバイセルを用いることで、1種類の膜タンパク質結晶のみで構造解析が可能となる全く新しい膜タンパク質結晶化技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膜タンパク質 bR のサンプル調整

研究に用いる膜タンパク質 bR の発現と精製を行った。bR を生産する好塩菌の培養および紫膜の精製プロトコールは既に確立されているが、発現量を増やすため以下のように培養の最適化を行った。菌体は野生株 RIM1 を用いて 500 mL 培養液を 37 °C で取り扱った。培養中は定期的に OD660 を測定し、この値が 0.7 付近で本培養に移行した。培養期間は約 3 日間であった。次に培養液を 10L 培養液へスケールアップし 37 °C で約 6 日間通気培養を行った。その結果、100mg の bR 精製標品の取得に成功した。またサンプルのロット差を無くすため、A280/A570 の値(標準値 2.2)をサンプル精製度の指標とした。

(2) 新規バイセルを用いた bR の結晶化

バイセルは、DMPC などの長鎖リン脂質と CHAPSO などの界面活性剤を混合して構築することができる。これらの混合比、濃度を系統的に変化させることで新規バイセルを調整し、bR を再構成させた。次に、溶液攪拌法を適用し bR-バイセル結晶の高品質化を行った。

(3) 重原子標識バイセルを用いた重原子誘導体結晶の調整

臭素 (Br) 原子で標識化した Br-DMPC を合成した後、新規 Br-DMPC バイセルを用いて bR-Br 標識バイセルの結晶化を行った。次に、シンクロトロン放射光を用いた X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定によって Br 標識脂質

が結晶中に取り込まれていることを確認した。さらにX線回折実験により結晶の品質を評価し、Br 標識バイセルの有効性を検証した。

4. 研究成果

(1) 新規バイセルの開発

これまでバイセル結晶化に用いられた脂質は DMPC と DTPC のみであり、バイセルの検討が十分になされてこなかった。脂質は膜タンパク質の活性や構造に影響すると同時に、バイセルの物性を決める重要な因子であり、結晶成長に大きく影響している可能性がある。そこでバイセルを構成する脂質と界面活性剤の種類や、結晶化温度等のパラメータを変化させ、結晶化の傾向を観察した。さらに、脂質については DMPC だけでなく、これまで報告例の無い3種類の脂質(DMPG, DMPA, DPhPC, DPPC)を用いた新規バイセルの開発を行い bR 結晶化条件の最適化を行った。まずバイセルを用いた bR 結晶化において、DMPC が紫膜中に含まれない脂質であることに注目し、紫膜に多い酸性頭部をもつ DMPG や DMPA、好塩菌の細胞膜に一般的なアシル鎖をもつ DPhPC の3種類の脂質を用いて新規バイセルを作製し、bR 結晶化検討を行った。その結果、DPPC 以外の全てのバイセルから bR 結晶を得ることに成功した。しかし、得られた結晶は微結晶やクラスター結晶となり構造解析には適さなかった。

これらの結果は、膜タンパク質と親和性が高いと想定した脂質を選択したにも関わらず、結晶の品質が低下したことになる。この原因として、脂質の変更がもたらす脂質二重膜の相状態の変化が、結晶生成に不利に働いていたと考えられる。そこで、結晶成長時のバイセル脂質膜の相状態を調製することで、良質結晶の取得を目指すことにした。負電荷をもつ脂質二重膜による影響に重点をおき、DMPC 以外に図2に示した3種類のリン脂質を選んだ。

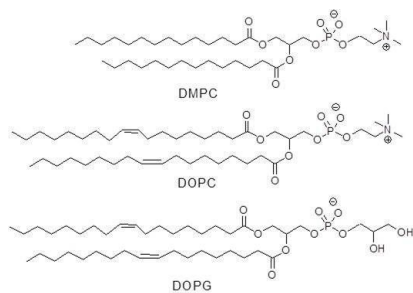


図2 bR 結晶化に使用したリン脂質

(2) bR-新規バイセルの結晶化検討

新規バイセルを用いて、bR の結晶化検討を行った。3種類の脂質は、DMPC に対して 10 ~ 20mol%加えた。結晶化剤は既に報告された bR 結晶化条件を参考にし、リン酸二水素ナトリウム、1,6-ヘキサジオール、トリエチレングリコールを用い、濃度をそれぞれ変化させた。また、脂質二重膜の相状態の影響

を調べるため、結晶化温度は 20 と 30 の2条件で行った。また、DOPG は酸性頭部を持つため、結晶化剤の pH も探索条件に加えた。結晶化検討結果を図3に示す。その結果、3種類の脂質から調整した全てのバイセルから結晶は得られたものの、それらの結晶化傾向は異なっていることが観察された。具体的には、リン酸濃度を 2.9M 以上で実施した条件では、大きさ 50ul 以下の細かい微結晶しか得られなかった。一方、2.0M 以下の条件では、紫色の透明のままあるいはアモロファス結晶しか得られなかった。

次に、これらの低品質結晶を改善するため溶液攪拌法を適用したが高品質結晶を得ることはできなかった。最終的に、DMPC/CHAPSO バイセルが、bR 結晶化には最適なバイセルであると判断した。

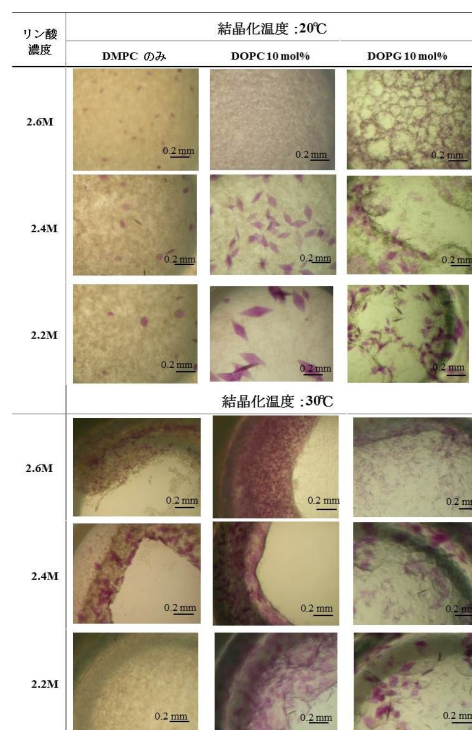


図3 bR-新規バイセル結晶

(3) Br 修飾リン脂質を用いた bR-Br バイセル結晶の構造解析

先の結果から、DOPC の混合や結晶化温度を上げることで脂質二重膜の流動性が変化し、バイセル結晶化に有利に働く可能性が示唆された。しかし、現時点では DMPC が bR 結晶化には最適であったため、Br 修飾リン脂質の合成は DMPC で進めることとした(Br-DMPC)。この Br-DMPC (図4) については構造が Br 原子を含むこと以外は DMPC と同じであり、DMPC の代替としてバイセルの二重膜部分に用いる事が可能であると考えた。

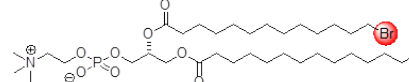


図4 重原子修飾リン脂質 Br-DMPC

結晶化実験の結果、Br-DMPC を用いた bR 結晶を得ることに成功した。次に SPring-8 の BL44XU にて XAFS 測定および X 線回折実験を行った。その結果、Br-K の吸収端を得る事に成功し、また 2.1 Å 分解能の回折強度データ収集にも成功した。さらに、構造解析の結果、bR 結晶構造中に Br 原子の位置を観察することに成功し、この Br 原子の位置を参考に DMPC の構造の同定を行なった。新たに同定した結晶構造と電子密度分布図を図 5 に示した。

特に、これまで PDB に登録された bR 周辺のリガンドの構造のうち、リン脂質の構造を化学合成的な根拠に基づいて決定できたのは今回が初めてである。また、リン脂質が二重膜を形成している様子を再現するように、リン脂質同士が疎水性のアルキル鎖をお互いの分子に向けるように配置している事が分かった。

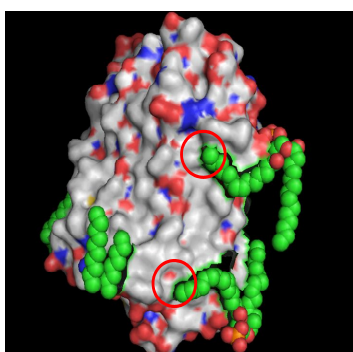


図5 Br位置を基にDMPCの同定を行った
bR 結晶構造

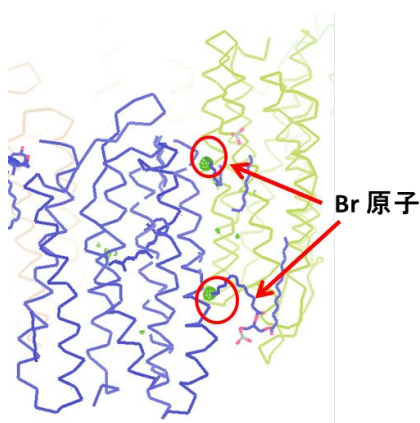


図6 Br-DMPC バイセル-bR の結晶構造

(3) まとめ

Br 原子を末端に標識した脂質でバイセルを形成し、bR の結晶化を行った。その結果、2.1 Å 分解能の回折データを得ることに成功した。bR は精製後も、生体由来の脂質が大部分残っており、それらの脂質に取り込まれたまま結晶化することが知られている。Br-DMPC バイセル-bR 結晶構造では、Br 原子の電子密度を 2 箇所観察することができた(図 6)。これは、Br 標識脂質が生体由来の脂

質と置き換わり、bR に特異的に結合していることを示しており、膜タンパク質に対する脂質の選択性を証明する興味深い結果である。しかし、SAD 法による位相決定には至らなかった。この原因は、26kDa の膜タンパク質全体の構造を決めるには、1 個の Br 原子のみでは異常散乱効果が小さかった可能性もあるが、Br 原子の低占有率が主な原因であった可能性も考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

M. Murata, S. Sugiyama, S. Matsuoka, and N. Matsumori, Elucidation of the bioactive structure of membrane lipids and natural products, *Chemical Record*, 査読有, (2015), in press

M. Sugahara, E. Mizohata, E. Nango, M. Suzuki, T. Tanaka, T. Masuda, R. Tanaka, T. Shimamura, Y. Tanaka, C. Suno, K. Ihara, D. Pan, K. Kakinouchi, S. Sugiyama, M. Murata, T. Inoue, K. Tono, C. Song, J. Park, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, M. Yabashi, S. Iwata, Effects of Gel-Solution Interfaces on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein, *Nat. Method*, 査読有, 12, (2015), 61–63

S. Sugiyama, K. Kashiwagi, K. Kakinouchi, H. Tomitori, K. Kanai, M. Murata, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori and K. Igarashi, Crystallization and preliminary crystallographic studies of PotA, a membrane-associated ATPase of the spermidine-preferential uptake system in *Thermotoga maritima*, *Acta Crystallogr.*, 査読有, F70, (2014), 738–741

Y. Aoki, M. Maruyama, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, and Y. Mori, A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, (2014), No. 065502 (6 pages)

H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, *Chemical Society Reviews*, 43, (2014), 2147–2158

M. Hirose, S. Sugiyama, H. Ishida, M. Niiyama, D. Matsuoka, T. Hara, E. Mizohata, S. Murakami, T. Inoue, S.

Matsuoka, and M. Murata, Structure of the human heart fatty acid-binding protein in complex with the fluorescent probe 1-anilino-naphthalene-8-sulphonic acid, *J. Synchrotron Radiat.*, 20, (2013), 923–928

〔学会発表〕(計 8 件)

杉山成, 齋木悠, 島田真典, 垣ノ内啓介, 新山真由美, 花島慎弥, 溝端栄一, 井上豪, 松森信明, 村田道雄, 膜タンパク質研究基盤の構築に向けた合成リン脂質の利用, 第 15 回蛋白質科学会年会, 2015. 6. 24, 徳島市あわぎんホール
日下裕規, 喜多俊介, 吉田康貴, 笠井宜征, 新山真由美, 杉山成, 村田道雄, 黒木喜美子, 前仲勝実, カイコ発現系を利用した CD1d- 2m 複合体の調製と結晶構造解析, 第 15 回蛋白質科学会年会, 2015. 6. 24, 徳島市あわぎんホール
齋木悠, 花島慎弥, 村田道雄, 松森信明, 溝端栄一, 井上豪, 川竹悟史, 垣之内啓介, 杉山成, 重元素化脂質含有バイセルを用いた膜タンパク質結晶化法の検討, 日本化学会 第 95 春季年会, 2015. 3. 29, 日本大学理工学部船橋キャンパス
日下裕規, 喜多俊介, 吉田康貴, 笠井宜征, 新山真由美, 杉山成, 村田道雄, 黒木喜美子, 前仲勝実, カイコ発現系を利用した CD1d- 2m 複合体の調製と結晶構造解析, 生物物理学会北海道支部例会, 2015. 3. 13, 北海道大学
溝端栄一, 福田庸太, 鈴木守, 南後恵理子, 菅原道泰, 矢橋牧名, 登野健介, 城地保昌, 松村浩由, 林高史, 杉山成, 村田道雄, 高木淳一, 井上豪, 岩田想, XFEL 連続フェムト秒結晶構造解析: 構造生物学の新時代, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014. 6. 25, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア
川竹悟史, 梅川雄一, 松岡茂, 杉山成, 園山正史, 村田道雄, バクテリオロドプシンを機能的に再構成する膜脂質の検討, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014. 6. 25, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア
齋木悠, 島田真典, 垣之内啓介, 川竹悟史, 杉山成, 松森信明, 村田道雄, 膜タンパク質と膜脂質の相互作用解析を目指した膜蛋白質 - バイセル結晶化, 日本化学会秋季事業 第 3 回 CSJ 化学フェスタ, 2013. 10. 21, タワーホール船堀
H. Ishida, S. Sugiyama, M. Hirose, S. Lethu, H. Ano, F. Sato, D. Matsuoka, T. Hara, E. Mizohata, T. Inoue, S. Matsuoka, and M. Murata, Novel fatty acid analogues for the understanding of lipid-protein interactions, The International Conference on Structural Genomics 2013 (ICSG2013), 2013. 7. 30, Sapporo, Japan

〔図書〕(計 1 件)

杉山成 他, 株式会社シーエムシー出版, タンパク質結晶の最前線, 2013, 288

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA SHIGERU)
大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授
研究者番号: 90615428