

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670012

研究課題名(和文) GPCRを安定に可溶化できるリン脂質類似体の開発と高分解能NMR構造解析への展開

研究課題名(英文) Development of phospholipid analogs for stable solubilization of membrane proteins and application for high resolution NMR analysis

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は多くの薬の標的となっているが、そのままでは水に溶解しないため溶液NMRによる構造解析には制限がある。本課題では従来よりもサイズが小さく、膜タンパク質の機能を妨げない新規可溶化剤 cholyl-PCを用い、膜タンパク質の可溶化と構造解析用試料調製を行った。バクテリオロドプシンはcholyl-PC中で50、1週間もの間安定であった。また無細胞合成により、N末端を蛍光色素で特異的に標識した $\beta$ 2アドレナリン受容体を合成可能なことがわかり、今後native構造の受容体を得るため検討すべき事項を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins are important drug targets, however, structural investigations by solution NMR have limitations due to aqueous insolubility of membrane proteins. The phospholipid-based agent cholyl-PC was examined to solubilize membrane proteins into micelles with small size. Cholyl-PC preserved native structure of solubilized bacteriorhodopsin for 1 week even at 50 . By using a cell-free system, another membrane protein,  $\beta$ 2 adrenergic receptor, was synthesized, the N-terminus of which was specifically labeled with a synthetic fluorophore.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜タンパク質 可溶化剤 脂質ナノディスク 無細胞合成

## 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するとは限らない。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が得られる強力な手法であるが、立体構造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 7 回膜貫通(7TM)型のバクテリオロドプシン(bR)は分子量が約 27 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。既存の二分子膜環境としてはリポソーム、アポリポタンパク質-脂質複合体ナノディスク構造、バイセル等があるが、いずれも表に示すようにキャリア単独で構造解析可能な分子量を超えており、7TM 型タンパク質の  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -TROSY 化学シフト値測定や部分的なアミノ酸帰属は可能 (Structure (2013)21, 394, JACS (2013) 135, 1919) だが構造解析は難しい。小さい分子量を達成するため、界面活性剤による可溶化が行われているが、ミセル中では生体膜環境本来の構造が得られない場合も多いため、二分子膜環境中と同等の化学シフト値を与えるか等の検証が必須である。従って現在、脂質二分子膜環境を提供し、かつ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

申請者らはこれまでに、リン脂質ファスファチジルコリンの sn-2 位をコール酸に置換した可溶化剤(Choly1-PC)が、従来の界面活性剤よりもさらに小さい分子量で bR を可溶化できる(タンパク質+可溶化剤で約 53 kDa) ことを見出しているが、長時間の安定性に問題があり、凝集が見られた。そこで、脂質頭部に負電荷を持つ類似体を複数合成し、静電反発による凝集防止を試みる。bR、 $\beta_2\text{AR}$  可溶化体のサイズを蛍光相関分光法、フォールディングを可視吸収スペクトルやリガンド結合で評価する。さらに、安定同位体標識を行い、溶液 NMR による構造解析を目指す。膜タンパク質を脂質二分子膜と同様の環境で可溶化し、安定に保つ

ことができれば、分子量が小さく、高分解能溶液 NMR に適した可溶化体を創成できる。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、また、膜タンパク質を標的とした薬物スクリーニングへの応用も期待され、構造・ダイナミクス・創薬研究に大きなインパクトを与える。膜タンパク質の構造や機能を解明する上で、その構造・機能を保ったまま可溶化することは重要であるが、前述したように既存の脂質二分子膜系は分子量が大きく NMR 構造解析に用いるのは難しい。そこで次善の策として、なるべく「マイルド」な界面活性剤を用いて膜タンパク質を可溶化する試みが行われている。しかし、脂質アシル鎖がポリペプチド伸張方向に沿って配向している脂質二分子膜系と異なり、界面活性剤ミセル中では、疎水基部分の膜タンパク質に対する配向がより無秩序になっており膜タンパク質活性を損なう場合が多いと考えられる。比較的安定性の高い $\beta$ バレル型膜タンパク質では界面活性剤中での解析例が多くある (FEBS Lett. (2003) 555, 144) が、より不安定な 7TM 型の膜タンパク質の三次元構造解析例は殆どなく (Nat. Struct. Mol. Biol. (2010)17, 768) 限界がある。本研究は、生体膜中でのタンパク質と脂質の相対的な配向が、脂質二分子膜環境と同じになりかつタンパク質表面を一層だけ覆うことにより可溶化できるよう可溶化剤をデザインする点で、優れた可溶化剤を積極的に見出そうとするものである。従ってこれまでにないユニークな特性をもった可溶化分子を見出す可能性が十分にある。

## 3. 研究の方法

これまでに合成法を確立している、フォスファチジルコリン (PC) の 2 本のアシル鎖のうち一本をコール酸で置換した可溶化剤 (Choly1-PC, 分子量:912) をベースに脂質頭部をフォスファチジン酸 (PA)、に変更した化合物 (Choly1-PA) を合成した。Choly1-PC の合成は、18:1 リゾフォスファチジルコリンを、コール酸と縮合させることにより行った。同様の方法で 18:1 リゾフォスファチジン酸とコール酸の縮合を試みたが、反応効率が非常に低いことがわかった。そこで、PC を PA とコリン基に加水分解する酵素ホスホリパーゼ D を Choly1-PC に作用させ、Choly1-PA への変換を行った。(Methods Enzymol. 14, 208 (1969)). 可

溶化した bR が native 状態かどうかは、レチナールの吸収スペクトル測定により評価した。また、可溶化体のサイズは、蛍光標識 bR の蛍光相関分光 (FCS) 法により評価した。

昆虫細胞由来の無細胞合成系として、transdirect insect cell kit (島津製作所) を用いた。タンパク質発現は SDS-PAGE 後、蛍光撮影装置 (LAS4000, 富士フイルム) で確認し、脂質ベシクルや alprenolol-agarose ビーズの蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C1Si) で行った。

#### 4. 研究成果

種々の温度で NMR 測定に必要となる時間 (数日間) での構造の安定性を調べ、最適な可溶化剤、温度の組み合わせを調べた。

Choly1-PC を再合成し、bR を変性させずに可溶化できる事、熱安定性が高い事を確認した。50°C で 1 週間インキュベート後でも 90% 以上の bR が構造を保持している事がわかった。また 60°C では 1 週間インキュベート後 50% 程度が構造を保っていた。蛍光標識 bR の FCS 測定により、Choly1-PC が 46 分子程度で 1 つの bR を可溶化していることが示唆された。Choly1-PA や Choly1-PC / Choly1-PA 混合物では bR の可溶化能の改善は見られなかった。

高度好塩菌から bR を精製するための紫膜のゲル濾過条件の検討を行った。bR を Choly1-PC で可溶化し、可溶化剤を含まない溶離液で分析したところ、bR を含む画分が得られたことから、bR は Choly1-PC と強く相互作用し可溶化されていると考えられる。また紫膜から Choly1-PC で bR を可溶化する際に、過剰量の Choly1-PC が必要なことが問題だったが、40°C で 1 日可溶化する事で 60% 以上の bR を可溶化でき、これを限外ろ過によって濃縮することで高濃度の可溶化 bR を得られることがわかった。安定同位体標識した bR を得るため、高度好塩菌の同位体標識培養を行った。これまでの検討で培養液 1L あたり、10 nmol 弱の同位体標識 bR しか得られていないため、発現量の改善が必要である。

GPCR の無細胞合成について、昆虫細胞由来の無細胞合成系で非天然蛍光アミノ酸 (TAMTA-C6-AF) を N 末端に導入し、コイルドコイル用タグ (E3) も付加した  $\beta_2$  アドレナリン受容体 (TAMRA-E3- $\beta_2$ AR) の合成系を用いてリガンド結合能を持つ受容体を得られるか検討した。各種界面活性剤、可溶化剤、受容体リガンド存在下での合成を試みてきたが、アフィニティービーズ (alprenolol-agarose) への結合が見られず、正しく構造形成した  $\beta_2$ AR が得られなかった。次に生体膜の可溶化能を持ち、膜タンパク質機能を保ったままナノディスク化できるとされるスチレン-マレイン酸共重合体 (SMA) 存在下での合成を試みた。Cray Valley 社 SMA2000 を加水分解したもの (Biophys. J. 108, 279 (2015)) を用いたが、SMA 添加により合成が阻害された。また合成後に SMA を添加したところ、受容体は溶液中に分散していたがリガンド結合は見られなかった。

これらの条件検討で、無細胞合成した TAMRA-E3- $\beta_2$ AR が大きな凝集体を形成する 경우가多数あり、フォールディング過程と競合していることがフォールドした受容体が見られない問題の一つだと考えられた。そこで、GPCR を含む膜タンパク質のリコンビナント合成効率、膜挿入を改善させる事が報告されている mistic タンパク質 (110 アミノ酸) を  $\beta_2$ AR の N 末端に導入した融合体を用いて、凝集抑制、膜挿入効率上昇を試みた。これまで用いて来た E3- $\beta_2$ AR と少なくとも同程度の合成効率で mistic- $\beta_2$ AR を無細胞合成可能なことがわかった。また、無細胞合成後に RNase 処理してから Biobeads 処理する事で、未標識の蛍光色素の大部分を除去できることがわかった。蛍光色素 Rhodamine Green (RG) を用いた場合も TAMRA 同様に N 末端を標識することができた。

合成した RG-mistic- $\beta_2$ AR の溶解性を FCS 測定で調べた所、buffer 中 (10 mM HEPES, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 25 mM KCl, pH7.8) や、DDM 添加時には大部分の受容体が凝集するが、SDS や N-lauroylsarcosine

添加時には可溶化されることがわかった。次に、無細胞合成液を希釈して、アガロース上の乾燥膜を水和することで、水和と同時に受容体を脂質ベシクルに組み込めないか検討した。界面活性剤非存在下では、大きな凝集体が見られ、ベシクルに組み込まれた受容体は見られなかった。また N-lauroylsarcosine を最終濃度が cmc (14 mM) より十分小さい 272 $\mu$ M で添加したところ、大きな凝集体は消失しベシクルに受容体由来の蛍光が観測された。

N-lauroylsarcosine は変成作用が強いと考えられるため、N-lauroylsarcosine と低濃度の DDM を順次添加してからベシクルへの挿入を試みたが、DDM 追加によってベシクル挿入効率は減少した。Cmc 付近の sugar-based-detergents 存在下で、ベシクルにバクテリオロドプシンを再構成できるとの報告 (PNAS 110, 7276 (2013)) があるため、より高濃度の DDM 存在下でのベシクル水和も行った。ベシクルに導入される蛍光標識受容体の量は増加したものの、マルチラメラ状または球状ではないベシクルが多く見られた。またここに蛍光標識リガンド (CA200689) を添加した所、ベシクルに共局在するように見えたが、非蛍光リガンドを過剰に加えても解離しない事から、非特異的結合の寄与が大きく特異的結合があるか調べる事が困難だった。CA200689 の膜への非特異的吸着が強いため、今後疎水性がより低く吸着の低減が予想される蛍光リガンド (CA200700) も検討し改善の必要があることがわかった。

また、アフィニティービーズ (alprenolol-agarose) への結合能を持つ RG-mistic- $\beta_2$ AR の形成条件も検討した。DDM と cholesteryl hemisuccinate (CHS) の混合ミセルは、bicelle 様の構造を形成し、GPCR を安定に可溶化できると報告されている (Methods 55, 310 (2011)) ため、DDM/CHS

(5/1) ミセル中での構造形成を試みた。N-lauroylsarcosine 添加、または per チューブ中でプローブ型ソニケーション処理により、DDM/CHS ミセル中に RG-mistic- $\beta_2$ AR を導入した。 $\beta_2$ AR の allosteric modulator である  $Zn^{2+}$  存在下では、特に DTT 還元条件で凝集が促進する事、0.4M アルギニンを追加したバッファー中では凝集が抑制される事がわかったが、アフィニティービーズへの結合は見られなかった。

以上、無細胞合成した蛍光標識 $\beta_2$ AR を、リガンド結合できる構造にフォールドさせる条件は見出せなかったものの、mistic- $\beta_2$ AR の合成、未反応色素除去、可溶化の条件を明らかにし、アフィニティービーズへの結合を検証可能な状態とした。今後、構造形成条件を見出す為の条件としては特に、酸化還元状態・pH・ $Zn^{2+}$ 濃度を系統的に変化させ検討する必要がある。また何らかのリガンド存在下での検討が必要だと思われる。本年度の検討は主に mistic- $\beta_2$ AR を用いて行ったが、E3- $\beta_2$ AR と比較して buffer への溶解性は大きくは変わらなかったため、両者を今後の構造形成条件の検討候補にできると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[[その他]]

ホームページ等

京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学  
分野のホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎勝巳 (KATSUMI MATSUZAKI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00201733

### (2) 研究分担者

矢野義明 (YOSHIAKI YANO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60402799

### (3) 研究分担者

星野大 (MASARU HOSHINO)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70304053