

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：74408

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06844

研究課題名(和文)新規酵素様糖脂質MPlaseの合成と膜タンパク質膜挿入活性の作用機構解明

研究課題名(英文) Synthesis of partial structure of glycolipid MPlase for elucidating the mechanism on membrane protein integration in the inner membrane of *E. coli*.

研究代表者

藤川 紘樹 (FUJIKAWA, Kohki)

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・構造生命科学研究所・研究員

研究者番号：50755874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：適切に設計された単糖を連結し、糖鎖伸長やGlcNAc6位のAc基修飾に対応した3糖を合成した。得られた3糖をリン酸化し、リン脂質と反応させることで、MPlaseの最小単位である3糖ピロリン脂質の合成を達成した。合成した3糖ピロリン脂質(Ac基有り、無し)を用いて、膜タンパク質膜挿入活性試験を行ったところ、GlcNAc6位にAc基を持つ3糖ピロリン脂質は天然のMPlaseの4分の1程度の活性を示し、GlcNAc6位にAc基を持たない3糖ピロリン脂質はほとんど活性を示さなかった。大腸菌の膜タンパク質膜挿入には、MPlaseのある程度の糖鎖長とGlcNAc6位のAc基が重要である事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Trisaccharide of MPlase, which can elongate saccharide unit and can introduce Ac group into 6-OH of GlcNAc was synthesized from properly designed monosaccharide unit. Trisaccharide obtained was phosphorylated and was coupled with phosphatidic acid for the synthesis of minimum structure of MPlase, named as mini-MPlase. Both mini-MPlase with Ac group and mini-MPlase without Ac group were subjected into membrane protein integration test. Mini-MPlase with Ac group showed 25% integration ability of natural MPlase, while mini-MPlase without Ac group provided almost no integration ability. These results indicate that some extent length of the saccharide and 6-OAc group of GlcNAc are critical for the membrane protein integration in the inner membrane of *E. coli*.

研究分野：糖鎖合成化学

キーワード：糖脂質 膜タンパク質 膜挿入

1. 研究開始当初の背景

全ての生命は、細胞膜に存在する膜タンパク質を介して、細胞外の情報を受け取ったり、内外に代謝物を流通させたりしているため、タンパク質の膜挿入は、基本的な分子機構が全生物で保存されている最も重要な生命活動の一つである。最近、岩手大学の西山は、大腸菌の内膜から膜タンパク質を膜に挿入させる際に必須の新しい因子 MPlase を発見した。我々のグループは、西山と共に、膜タンパク質挿入活性を指標に MPlase の精製を進めた結果、MPlase はタンパク質成分を含まない新規の糖脂質であることを見出した。これまでに、タンパク質の膜挿入に非タンパク質性の糖脂質が関与する知見はなく、グライコリポザイム・グライコシャペロンという新しい概念を提起している。これまでの大腸菌由来の MPlase を用いた研究から MPlase のタンパク質膜挿入活性には、「*O*-アセチル基による糖鎖修飾」及び「リン酸基」が必須であることが示されたが、「タンパク質との相互作用」や「細胞膜へのタンパク質挿入活性」を可能にしている MPlase の最小構造や立体構造など、分子・官能基レベルでの活性発現機構は明らかにされていない。本研究では、糖鎖伸長や *O*-アセチル基による糖鎖修飾を見据えた MPlase の部分構造の合成法を確立し、合成した MPlase の類縁体を用いて、MPlase の膜タンパク質挿入活性機構を分子・官能基レベルで明らかにする事を目的とする。

2. 研究の目的

MPlase の厳密な構造活性相関の検証を困難にしている要因として、以下の3点が考えられた。大腸菌の内膜から抽出してくる MPlase は、機能解明を目的としたプローブ化などの分子変換が難しい事。天然由来の MPlase には、*O*-アセチル基による糖鎖修飾の位置や数、糖鎖及び脂肪酸の長さ不均一性が存在する事。□大腸菌から抽出してくる MPlase は、極微量であること。本研究では、有機合成化学的手法によって、均一な糖鎖を、目的に応じた形で、十分量供給する事で、これらの課題を解決する事とした。具体的には、「3糖繰り返し構造」、「*O*-アセチル基による糖鎖修飾」及び「ピロリン酸を介したジアシルグリセロール」に対応した3糖を設計し、効率的な MPlase 類縁体の合成を行う。得られた MPlase 類縁体を膜タンパク質膜挿入活性試験に供し、MPlase の構造と活性の相関を分子、官能基レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、()MPlase 類縁体の化学合成と ()膜タンパク質膜挿入活性評価、膜挿入機構の解析からなる。

()MPlase 類縁体の化学合成

適切に保護されたグルコサミン、グルコース、フコサミンから、MPlase の基本3糖構造の合成を行い、リン酸化試薬と反応させることで、MPlase の基本骨格である3糖ピロリン脂質の合成を行う。

()膜タンパク質膜挿入活性試験

我々は、MPlase と大腸菌由来のリン脂質、ジアシルグリセロールから、リポソームを作製し、無細胞タンパク質合成系に合成させた放射性 ³⁵S 標識タンパク質 (Pf3 ファージコートタンパク質) のリポソームへの取り込み量から膜挿入率を算出している。膜タンパク質膜挿入反応後、プロテアーゼ処理を行い、リポソームに取り込まれなかった(膜挿入されなかった)タンパク質を切断後、SDS page を行い Pf3 ファージコートタンパク質の放射線量を測定する事で、リポソームに取り込まれた(膜挿入された)タンパク質量を算出する。

4. 研究成果

適切に保護された単糖ユニット(グルコサミン、グルコース、フコサミン)を連結し、糖鎖伸長や GlcNAc6 位の Ac 基修飾に対応した3糖ユニットを合成した。得られた3糖をリン酸化し、ジアシルグリセロールと Bn 基を持ったホスホロアミダイト試薬と反応させることで、MPlase の最小単位である3糖ピロリン脂質 mini-MPlase (1) の合成を達成した。

膜タンパク質膜挿入活性試験では、大腸菌由来のリン脂質、ジアシルグリセロールに対して5%量(重量%)の MPlase 類縁体を含むリポソームを作製し、無細胞タンパク質合成系 (PURE system) に合成させた放射性 ³⁵S 標識タンパク質 (Pf3 ファージコートタンパク質 3L-Pf3) のリポソームへの取り込み量から膜挿入率(膜挿入されたタンパク質量 ÷ 合成された総タンパク質量 × 100)を算出した。(試験回数3回、n=3)

膜挿入活性試験の結果、MPlase を含まないリポソーム (control) の膜挿入率が $1.4 \pm 0.3\%$ であったのに対し、大腸菌由来の天然 MPlase を含むリポソームは、 $20.9 \pm 2.1\%$ となった。化学合成した mini-MPlase (1) を含むリポソームは $5.0 \pm 0.8\%$ 、mini-MPlase (1) 6-OH を含むリポソームは $1.9 \pm 0.3\%$ という膜挿入率となった。mini-MPlase (1) は、天然 MPlase の10分の1程度の長さだが、膜挿入率は天然 MPlase の4分の1程度を示した。但し、今回は重量%で同じになるように MPlase 類縁体を加えているため、分子量の小さな合成物はモル数では天然物の5~6倍程度添加されている。従って、モル濃度で比較した場合には天然物よりもかなり活性が弱いことになる。しかし、弱いながらも確実に活性があることが示されたので、今後の糖鎖の伸長による活性向上が期待できる結果となった。一方、

mini-MPlase (1) 6-OH は、殆んど活性を示さなかった事から、GlcNAc6 位の Ac 基が膜タンパク質の膜挿入に非常に重要であるという従来の結果を再現できた。

次に、タンパク質膜挿入試験の反応液中に合成した mini-MPlase (1) を加える実験を行った。

MPlase を含まないリポソーム (control) の膜挿入率が、 $1.4 \pm 0.3\%$ であったのに対し、化学合成した mini-MPlase (1) を control の反応液に大量に加えると、 $19.0 \pm 3.1\%$ となった。一方、mini-MPlase (1) 6-OH を control の反応液に大量に加えると、 $5.0 \pm 0.5\%$ となった。また、化学合成した mini-MPlase (1) を天然 MPlase を含むリポソーム ($20.9 \pm 2.1\%$) に加えた際には、 $28.3 \pm 0.6\%$ と活性の増強が見られた。一方、mini-MPlase (1) 6-OH を天然 MPlase 含有膜に振りかけた際には、 $17.5 \pm 1.3\%$ とやや抑制される結果となった。

続いて、タンパク質膜挿入試験の反応液に加えた mini-MPlase (1) の濃度依存性を検証した。MPlase を含まないリポソーム (control) の膜挿入率が、 $1.4 \pm 0.3\%$ であったのに対し、化学合成した mini-MPlase (1) を control の反応液に様々な濃度 (0.01mg/mL 、 0.03mg/mL 、 0.1mg/mL 、 0.3mg/mL 、 1mg/mL) で加えると、濃度に依存して挿入率が高まる結果となった。糖鎖が短い MPlase でも、反応液中に十分量存在すると、強い活性を示すことが分かった。

以上のように、化学合成した 3 糖ピロリン脂質 [mini-MPlase (1)] を用いる事で、糖鎖長が短くても弱いながら確かに膜タンパク質膜挿入活性を示すことが分かった。また、mini-MPlase (1) を反応液に加えた場合には、その濃度に従って、挿入活性が高まる結果となった。一方、GlcNAc6 位に Ac 基を持たない 3 糖ピロリン脂質 [mini-MPlase (1) 6-OH] では、著しく膜挿入活性が低下する事が分かった。これらの結果は、溶液中で糖鎖がタンパクの凝集を防ぐという「MPlase のシャペロン様活性」が膜挿入反応に寄与している事を示唆するものであり、活性発現にはある程度の糖鎖長と GlcNAc6 位の Ac 基が重要である事が示された。

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 4 件)

新学術領域「中分子戦略」第 2 回若手シンポジウム

大腸菌の膜タンパク質挿入に関わる糖脂質 MPlase 部分構造の合成

藤川紘樹、永瀬良平、島本啓子

2016 年 8 月 19-20 日

日本糖質学会

大腸菌膜タンパク質挿入機構解明を目指した糖脂質 MPlase 部分構造の合成

藤川紘樹、永瀬良平、丹羽晶子、土屋聡、下田綾乃、西山賢一、島本啓子

2016 年 9 月 1-3 日

FCCA グライコサイエンス若手の会

大腸菌膜タンパク質挿入機構解明を目的とした糖脂質 MPlase 部分構造の合成

藤川紘樹、永瀬良平、丹羽晶子、土屋聡、下田綾乃、西山賢一、島本啓子

2016 年 10 月 22 日

日本農芸化学会

大腸菌膜タンパク質挿入機構解明に向けた糖脂質 MPlase 部分構造の合成

藤川紘樹、西山賢一、島本啓子

2017 年 3 月 17-20 日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 紘樹 (FUJIKAWA Kohki)

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・構造生命科学研究部・
研究員

研究者番号：50755874

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

研究者番号：