

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06143

研究課題名（和文）膜タンパク質膜挿入における糖脂質MPlaseのシャペロン様・酵素様活性機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Chaperone and Enzyme-like Mechanisms on Membrane Protein Integration by a Glycolipid MPlase

研究代表者

三浦 薫（野村薫）（Miura, 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・構造生命科学研究所・主席研究員

研究者番号：90353515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：リボソームで新しく合成された膜タンパク質が膜中で機能するためには、膜に正しい構造で挿入される必要がある。本研究では、Sec非依存性経路に着目し、固体NMRと蛍光測定により、大腸菌内膜への蛋白質挿入因子であるMPlaseを始めとする膜脂質により制御される蛋白質の膜挿入のメカニズム解明を行った。膜挿入は膜物性に強い相関があり、コーン型の分子は流動性を軽減して膜挿入を抑制する一方、逆コーン型のMPlaseは膜に相反する影響を与え、膜挿入を回復させた。また、MPlase-基質蛋白質間の静電相互作用も膜挿入に寄与しており、MPlaseはそのユニークな分子構造により、蛋白質の膜挿入を様々な形で支えていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生蛋白質の膜挿入には、Secトランスロコンを必要とする経路と非依存経路があり、後者においては膜蛋白質は自発的に挿入すると考えられてきたが、最近大腸菌内膜では糖脂質MPlaseが両経路において必須の因子であることがわかってきた。しかし、MPlaseがどのように「挿入酵素様」の作用を示すのか、その詳細は明らかになっていない。本研究は、種々の物理化学的手法を用いて、非依存経路のモデル系における糖脂質MPlaseの作用機構を理解しようとするものであり、Secトランスロコン依存性挿入の機構の初期段階を理解する上で大きな手掛かりとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Proper membrane integration is indispensable for nascent membrane proteins that emerge from the ribosomal tunnel to correctly functionalize in the membrane. In this study, we revealed how membrane lipids, including a membrane protein integrase, MPlase, regulate the protein integration using solid-state NMR and fluorescence measurements. Membrane integration has strong correlations with the membrane physicochemical properties. Cone-shaped molecules decreased the fluidity inside the membrane and inhibited the membrane integration. In contrast, MPlase possessing an inverted cone-shaped structure showed the opposite effects on the membrane properties and restored the integration. The electrostatic intermolecular interaction between MPlase and the substrate protein also affected the integration. The unique molecular structure of MPlase supports the membrane integration of proteins by a variety of approaches.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜挿入促進因子 MPlase 固体NMR 膜脂質 ピロリン酸 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の膜挿入のメカニズムは全生物で保存されている。親水性に富んだ細胞外ドメインを有する蛋白質は、疎水性の高い膜を透過するために大きなエネルギーを必要とするため、細胞では Sec トランスロコンと呼ばれる膜透過チャンネルが機能している。一方、分子量が小さく、疎水性の高い蛋白質は、Sec トランスロコンの助けを借りずに膜挿入する (Sec 非依存膜挿入経路)。以前は、Sec 非依存経路においては蛋白質が自発的に膜に挿入すると考えられていたが、岩手大学の西山らは、大腸菌における蛋白質の膜挿入ではどちらの経路においても、MPLase (Membrane Protein Integrase) と言われる因子が必須であることを見出した。さらに、当研究所の島本らを中心に MPLase の構造が決定され、MPLase は図 1 に示すように 3 種類のアミノ糖が 9~11 回繰り返した糖鎖とジアシルグリセロール (DAG) (図 1) がピロリン酸を介して結合した新規の糖脂質であることが分かった。Sec トランスロコンや共役する ATPase の蛋白質複合体の X 線結晶解析を始めとする構造生物学的な解析は複数のグループから報告されているが、いずれも MPLase を含まない系での解析である。これは、MPLase のようなフレキシブルな糖脂質が関わる事象はこれらの手法のみでは観測が困難であることが理由の一つであると考えられる。最近では MPLase 生合成経路の解析も進んでいる。生合成に関与する酵素が次第に明らかになり、この酵素を枯渇させると膜挿入反応は完全に阻害されることより、*in vivo* でも MPLase が重要な役割を果たすことが確認されてきた。

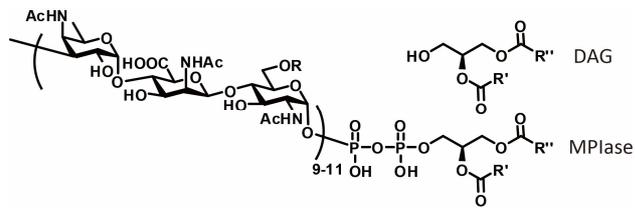


図 1、MPLase と DAG の構造

R=Ac または H, R', R'' = C16:1, 16:0, 18:1, 18:0 など

2. 研究の目的

MPLase はトランスロコン依存性の有無に関わらず蛋白質の膜挿入に必須であるため、MPLase は両挿入経路の初期段階において同様の作用メカニズムを示す可能性が高い。我々は、MPLase がリボソームから合成されたばかりの基質蛋白質の周りを取り囲んで凝集を抑制し、膜挿入を介添するシャペロン様の作用と、基質蛋白質と相互作用し膜に受け渡す挿入酵素様の作用を推定しているが、その機構は未だ明らかではない。本研究では、糖脂質と基質蛋白質の膜上での相互作用を分子、原子レベルで解析し、Sec 非依存性膜蛋白質挿入における糖脂質の役割を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

当研究所では、MPLase の最小活性構造である mini-MPLase-3 の有機合成に成功している。そこで、この合成 mini-MPLase-3 と大腸菌から精製した天然 MPLase を測定に用いる。Sec 非依存的な基質蛋白質としては、活性測定にも用いられてるバクテリオファージのコート蛋白質 Pf3 を選んだ。Pf3 の N 末端側は両親媒性、C 末端側は疎水性であり、C 末端部分に塩基性のアルギニンとリジン残基が存在する。本研究では、MPLase-基質蛋白質間の相互作用について、主に固体 NMR や蛍光測定といった物理化学的手法を用いてアプローチする。組成の異なる膜を調整し、Pf3 の膜挿入状態を固体 NMR で決定する。Pf3 は目的に応じて部位特異的に ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識し、効率よく検出する。

1) 基質蛋白質の膜挿入状態の解析

^1H - ^{15}N PISEMA NMR 法を用いて、シミュレーションスペクトルとのフィッティング解析により、Pf3 部分構造の膜配向角度を決定する。MPLase 存在下でも同様の解析を行い、MPLase が基質蛋白質の膜挿入に与える影響を評価する。

2) 膜構成要素の違いによる蛋白質膜挿入効率の比較

固体 NMR を用いた新規の蛋白質膜挿入効率の解析方法を確立し、この方法を用いて、膜脂質の構成要素の違いにより Pf3 部分構造の膜挿入効率が受ける影響を比較する。

3) 膜構成要素の違いによる膜挿入と膜物性変化の相関

2) で明らかになった、膜挿入効率の違いが膜脂質のどのファクターに起因しているかを、膜物性の観点から評価する。

4) 基質蛋白質と MPlase ピロリン酸部位の NMR による分子間相互作用解析

Pf3 部分構造と mini-MPlase-3 のピロリン酸との間の分子間相互作用を ^1H - ^{15}N HETCOR スペクトルの化学シフト摂動により解析する。Sec トランスロコン非依存的膜挿入をする基質蛋白質は、細胞内領域に塩基性アミノ酸を含むものが多い。また、多くの糖脂質やリン脂質はモノリン酸なのに対して、MPlase のリンカー部分はピロリン酸という特徴的な構造を取っている。固体 NMR を用いた分子間相互作用解析により、これらの特徴的な構造の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

基質蛋白質の膜挿入状態の解析

PISEMA 法を用いて、Pf3 の膜挿入状態の解析を行った。Pf3 の疎水性部分と塩基性アミノ酸 2 残基を含んだ C 末端側 27 残基の部分構造 Pf3_24 を用いて解析した結果、Pf3_24 はヘリックス構造を構成しており、膜の法線方向から 15 度程傾いた膜貫通状態にあることが分かった。さらに、mini-MPlase-3 存在下、非存在下における Pf3_24 の膜挿入角度を比較したところ、Pf3_24 が mini-MPlase-3 に結合したことにより運動性に影響はあるものの、膜挿入角度には変化がなかった。

膜構成要素の違いによる蛋白質膜挿入効率の比較

固体 NMR 法を利用して、疎水性のペプチドの膜挿入状態を解析する新規方法を確立した。大腸菌膜では内在性のジアシルグリセロール (DAG) とシンプルな脂質分子 (図 1) が自発的挿入を抑制し、MPlase が膜挿入を復活させるが、確立した解析方法を用いて、まずは MPlase と DAG にはそれぞれ膜挿入、抑制効果があることを確認した。さらに、大腸菌を構成する脂質の一つであるフォスファチジルエタノールアミン (PE) にも膜挿入阻害効果があることを見出した。当初は、酸性アミノ酸であるフォスファチジルグリセロール (PG)、フォスファチジルセリン (PS) に膜挿入促進効果があると予想していたが、膜脂質の電荷は膜挿入にはあまり影響がなかった。一方、膜挿入は脂質の分子構造に依存しており、コーン型の構造をした膜脂質は膜挿入を抑制し、逆コーン型の膜脂質は膜挿入を促進させることが分かった。

膜構成要素の違いによる膜挿入と膜物性変化の相関

膜構成要素による膜界面のパッキングや流動性の違いを解析し、これら膜物性と膜挿入効率との相関を解析したところ、膜のパッキングが緩く、膜内部の流動性が高いほど、蛋白質は膜挿入しやすいことがわかった。特にリン脂質の頭部のサイズが小さい PE の存在割合が高くなるにつれて膜のパッキングはきつくなり、膜内部の流動性は低くなっており、膜挿入抑制効果と高い相関があった。DAG や MPlase は特に膜内部の流動性に影響を与えた。DAG は流動性を著しく抑え、MPlase はその抑えられた流動性をある程度は回復させていたが、十分に回復させることはなかった。このことより、MPlase は膜の物性を変化することに加えて、嵩高い糖鎖構造やピロリン酸によるシャペロン効果、酵素様活性により、その膜挿入活性を發揮していることが考えられる。

基質蛋白質と MPlase ピロリン酸部位の NMR による分子間相互作用解析

塩基性アミノ酸を選択的に ^{15}N で安定同位体標識した Pf3 の C 末端側 27 残基の部分構造 Pf3_27 と mini-MPlase-3 との間の分子間相互作用を ^1H - ^{15}N HETCOR スペクトルの化学シフト摂動により解析した。Pf3_27 の C 末端部位にある 2 つの塩基性アミノ酸残基、アルギニン、リジンの側鎖と mini-MPlase-3 との間に相互作用が観測されたが、特にアルギニン側鎖との相互作用が強いことがわかった。この結果は、膜表面に存在する MPlase のピロリン酸の負電荷が基質蛋白質の塩基性残基を引き寄せることが膜挿入の鍵になっていることを示唆している。

これらの結果より、MPlase を始めとする膜脂質による膜挿入の制御や、MPlase の基質蛋白質への酵素様作用のメカニズムを明らかにすることができた。今後は、MPlase のもう一つの作用と推定している新生蛋白質の凝集抑制作用の解析を進めることで、糖脂質による蛋白質膜挿入の全容の理解に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nomura, K., Yamaguchi, T., Mori, S., Fujikawa, K., Nishiyama, K., Shimanouchi, T., Tanimoto, Y., Morigaki, K., Shimamoto, K.. | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Alteration of membrane physicochemical properties by two factors for membrane protein integration | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biophys. J. | 6. 最初と最後の頁 99-110 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.05.014 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fujikawa, K.; Nomura, K.; Nishiyama, K. I.; Shimamoto, K. | 4. 巻 77 |
| 2. 論文標題 Novel glycolipid involved in membrane protein integration: Structure and mode of action | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Synth. Org. Chem. Jpn. | 6. 最初と最後の頁 1096-1105 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.77.1096 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fujikawa, K.; Suzuki, S.; Nagase, R.; Ikeda, S.; Mori, S.; Nomura, K.; Nishiyama, K. I.; Shimamoto, K. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Syntheses and Activities of the Functional Structures of a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 ACS Chem. Biol. | 6. 最初と最後の頁 2719-2727 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.8b00654 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 野村薫 | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 GPIアンカー型タンパク質における脂質アンカーの役割解明 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 生物物理 | 6. 最初と最後の頁 295-299 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.295 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 野村薫 |
| 2. 発表標題 蛋白質膜挿入因子MPlaseと抑制因子DAGによる膜物性変化 |
| 3. 学会等名 生有研シンポジウム “ 生体分子間に働く相互作用解析の現状と今後の可能性 ” |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野村薫、谷本泰士、林文雄、原田英里砂、単小遠、塩生真央、土方淳司、白井剛、森垣憲一、島本啓子 |
| 2. 発表標題 固体NMRを用いたイモリの肢再生制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明 |
| 3. 学会等名 日本膜学会第40年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森祥子、野村薫、山口敏幸、島内寿徳、谷本泰士、森垣憲一、藤川鉦樹、西山賢一、島本啓子 |
| 2. 発表標題 蛋白質膜挿入促進因子MPlaseと抑制因子DAGによる膜物性変化 |
| 3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| http://www.sunbor.or.jp/rd/lab01.html |
|---|

6. 研究組織

| | | | |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|