

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19057

研究課題名（和文）グラフトポリマーディスク：新規膜タンパク質解析プラットフォーム

研究課題名（英文）Graft Polymer Discs: A Novel Platform for Membrane Protein Analysis

研究代表者

西村 智貴（Nishimura, Tomoki）

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：60648070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、温度応答性グラフトポリマーを基盤としたポリマーナノディスクを開発した。ポリマーは、自己組織的に会合してナノディスクを形成し、生体膜とほぼ同程度の疎水領域のサイズを有することが小角散乱測定から明らかになった。また、無細胞タンパク質合成を用いることで、ナノディスクにモデル膜タンパク質を直接組み込むことができることも見出した。さらに、この手法により、膜タンパク質が正しく折り畳まれ、その機能が保持されていることも確認した。以上により、従来の膜タンパク質可溶化法の問題点を解決し、膜タンパク質構造解析の新しいツールとしての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、温度応答性グラフトポリマーベースのナノディスクを開発し、膜タンパク質の構造解析における課題の解決に寄与すると考えられる。この手法により、膜タンパク質が天然の構造を保持できることが示され、構造生物学研究における有用な技術となる可能性がある。今後、膜タンパク質の構造解析が進むことで、新しい治療薬の設計が期待される。特に、がんや神経変性疾患などの治療において、新たな治療法の開発が見込まれ、製薬業界やバイオテクノロジー分野で広く応用され、健康の向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed polymer nanodiscs based on temperature-responsive graft polymers to address the challenges in the structural analysis of membrane proteins. The polymers self-assemble to form nanodiscs, and small-angle scattering measurements revealed that these nanodiscs have hydrophobic regions similar in size to biological membranes. Additionally, we discovered that model membrane proteins can be directly incorporated into the nanodiscs using cell-free protein synthesis. Furthermore, this method confirmed that the membrane proteins are correctly folded and retain their functionality. These findings indicate that this new approach can solve the issues of traditional membrane protein solubilization methods and shows potential as a novel tool for membrane protein structural analysis.

研究分野：高分子材料

キーワード：ナノディスク 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、物質輸送やシグナル伝達などの機能を担うため、重要な創薬ターゲットである。膜タンパク質の構造に基づいて薬を設計できれば高い薬効が期待できる。しかし、膜タンパク質は細胞膜中に存在するため、その構造解析は困難である。この問題を解決するために、膜タンパク質を界面活性剤で可溶化し、構造解析が行われる。しかし、界面活性剤ミセルの疎水場は天然の生体膜環境とは異なるため、膜タンパク質が天然の構造と同一ではない可能性が課題となっている。従って、膜タンパク質可溶化における天然環境との非同一性に関する問題は、膜タンパク質構造解析の更なる進展に向けた課題である。

上記の問題を解決するため、生体膜と類似構造を持つナノディスクが膜タンパク質の構造解析に用いられつつある。ナノディスクは二分子膜を持つため膜タンパク質を可溶化できる。また、生体膜と類似の環境を有するため、膜タンパク質は天然構造を保つ。しかし、ナノディスクは平面の二分子膜部分とディスクのふちに異なる2つの曲率を有するため、単一の両親媒性分子の自己組織化により作製することが極めて困難である。加えて、ナノディスクへの膜タンパク質の再構成は多工程の操作が必要という問題もある。したがって、簡便にナノディスクを作製し、膜タンパク質を再構成できる方法を開発することができれば、従来の膜タンパク質可溶化法の問題点を解決できるとの着想に至った。

そのような中で、申請者は温度応答性グラフトポリマーベシクルを開発し、自己組織化過程で均一なナノディスクが融合することでベシクルを形成することを見出している。以上の知見より、ベシクル形成を抑制できればナノディスクを容易に得ることができると考えられる。さらに、このディスクを用いて無細胞タンパク質合成による膜タンパク質の直接再構成技術が確立できれば、多工程の膜タンパク質可溶化操作が不要となる。これらによって、既存の可溶化剤の問題を解決した膜タンパク質構造解析ツールを創出できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、この両親媒性グラフトポリマーを基盤とした簡便なナノディスク作製法の構築、無細胞タンパク質合成を用いたナノディスクへの膜タンパク質の直接組み込み法を確立する。これにより、既存の膜タンパク質可溶化法の問題点を解決した新しい膜タンパク質構造解析ツールを創出することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ①温度応答性グラフトポリマーを基盤としたナノディスク創製

poly(vinyl alcohol)-graft-poly(propylene oxide)や pullulan-graft-poly(propylene oxide) にコハク酸を修飾しアニオンとする。ここではコハク酸修飾率が10個/100繰り返しユニット前後で修飾率を変化させたグラフトポリマーを合成する。これにより静電反発を利用してディスク融合を抑制する。また、膜タンパク質のサイズと疎水層の厚みに大きな差があれば天然と同一の構造を形成しないことが考えられるため、PPOの重合度を1K~2.5Kの間で変化させた種々のポリマーを合成し、生体膜の厚み(3~5nm)と同程度に揃える。次に、得られたポリマーがどのような自己組織化体を形成するのかを把握するため、ポリマー集合体の構造解析を行う。ここでは動的光散乱、静的光散乱により粒子径を測定し、AFM、TEM観察により形態を把握する。並行して小角X線散乱を用いて疎水層の厚みを含めた詳細な構造情報を得る。

## ②ナノディスクによる膜タンパク質の可溶化能の評価

ここではナノディスクの存在下で無細胞タンパク質合成を行うことで、ナノディスクへ直接膜タンパク質を組み込む。具体的には血小板由来増殖因子レセプターの1回膜貫通ドメインを持った膜タンパク質を用いてナノディスクの膜タンパク質可溶化能を評価する。可溶化能を容易に評価できるように、赤色蛍光タンパク質(RFP)を連結した膜貫通ドメインを使用する。

## 4. 研究成果

### ①温度応答性グラフトポリマーを基盤としたナノディスク創製

まず、合成したアニオン性グラフトポリマーの水溶液中での自己組織化挙動をDLS、AFMにより調べた(Fig. 1)。その結果、流体力学的半径21 nmの粒子を形成していることが判明した。また、AFM測定から高さ10 nm程度の粒子を観察することができた。より詳細な構造を把握するためにSAXS測定を実施したところ、低角領域の散乱強度が散乱ベクトルに対して $-2$ 乗で減衰する散乱プロファイルが得られた。このことは、板状の集合体を形成していることを示唆している。そこで、core-shell diskモデルを用いて散乱プロファイルの解析を行ったところ、疎水性コアの厚み2.9 nm、親水性シェル

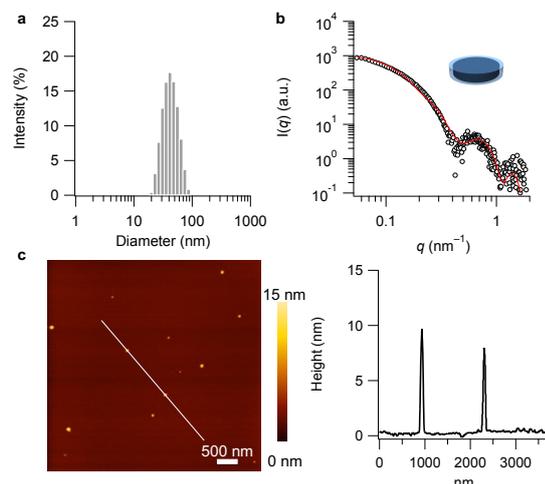


Fig. 1 a) ナノ粒子のサイズ分布、b) ナノ粒子の SAXS プロファイル(黒丸)と core-shell disk モデルの理論曲線(赤線)、c) AFM 像と高さプロファイル

の厚み 2.5 nm、直径 49 nm のパラメーターで散乱プロファイルと理論式が概ね一致することがわかった。以上から、合成したポリマーは水溶液中で会合してナノディスクを形成することが明らかとなった。

## ②ナノディスクによる膜タンパク質の可溶化能の評価

次に、項目①で得られたナノディスクの存在下で赤色蛍光タンパク質がリンカーを介して結合している血小板由来増殖因子レセプターの1回膜貫通ドメイン(モデル膜タンパク質)の無細胞膜タンパク質合成を行った。その結果、ナノディスク存在下では赤色蛍光タンパク質由来の蛍光シグナルが観察できるのに対し、ナノディスク無しでは赤色蛍光タンパク質の蛍光シグナルが観察できなかった。これは、ナノディスク存在下では合成した膜タンパク質がナノディスクに組み込まれ、正しく折り畳まれることで赤色蛍光タンパク質が蛍光を発したのに対し、ディスク無しでは膜貫通ドメインを組み込める足場がないために凝集し、蛍光を発さなかったものと考えられる。また、ナノディスクはリン脂質リポソームに比べても単位面積あたりでより膜タンパク質を組み込めることも明らかになりつつある。以上より、開発したアニオン性グラフトポリマーは水溶液中でポリマーナノディスクを形成し、そのナノディスクは無細胞タンパク質合成で生成した膜タンパク質を安定に組み込むことができることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Yusuke, Nishimura Tomoki	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent advances in the self-assembly of sparsely grafted amphiphilic copolymers in aqueous solution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 6343 ~ 6360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2PY01018F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Tomoki, Hatatani Yusuke, Ando Mitsuru, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-component nanodiscs via the thermal folding of amphiphilic graft copolymers with the adjusted flexibility of the main chain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 5243 ~ 5251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sc01674e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozawa Naoki, Kosaka Shunji, Fujii Shota, Nishimura Tomoki	4. 巻 14
2. 論文標題 Bilayer-domain formation of thermoresponsive amphiphilic block copolymers in hybrid liposomes for synthetic molecular channels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 2198 ~ 2204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3py00223c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozawa Naoki, Nishimura Tomoki	4. 巻 15
2. 論文標題 Macromolecular architectural effects on solution self-assembly of amphiphilic AB-type block copolymers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 349 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3py01324c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Yusuke, Fujii Shota, Takano Shin, Fukushima Jokichi, Ando Mitsuru, Kodera Noriyuki, Nishimura Tomoki	4. 巻 24
2. 論文標題 Manipulation of Macrophage Uptake by Controlling the Aspect Ratio of Graft Copolymer Micelles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 5838 ~ 5846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.4c01054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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
研究分担者	安藤 満  (Ando Mitsuru)  (70737460)	京都大学・医生物学研究所・助教    (14301)	

#### 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
---------	---------