

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05860

研究課題名(和文)多量体膜タンパク質のin situ機能解析を実現する新規ナノディスク創製

研究課題名(英文)Preparation of novel nanodiscs that allow to in site analysis of membrane proteins

研究代表者

井村 知弘 (IMURA, TOMOHIRO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長

研究者番号：10371022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ナノディスクとは、アポリポタンパク質がリン脂質二分子膜を包み込むように自己組織化したディスク状のナノ粒子であり、膜タンパク質の機能解析のための新しいプラットフォームとして注目されている。本研究では、独自に設計した界面活性型ペプチドを用いることで、これまで困難であったナノディスクの粒子径を制御することに成功した。さらに、無細胞合成によって発現させたAcetabularia Rhodopsin IIやproteorhodopsinなどの多量体膜タンパク質を、界面活性剤などの余計な添加物を使用することなく、その活性を維持したままナノディスク中に一段階で再構成できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微細な膜環境を有するナノディスクは、膜タンパク質の機能解析のための新しいプラットフォームとして注目されているが、その粒子径は、主にアポリポタンパク質の長さに依存するため、これまで制御することは困難であった。これに対して、本研究では独自に設計した界面活性ペプチドを用いることで、粒子径を制御することに成功した。また、無細胞合成によって発現させた多量体の膜タンパク質を、その活性を維持したまま、ナノディスク中に一段階で再構成できることを実証した。有害な界面活性剤を使用しない、本研究の“ナノディスクテクノロジー”は、生体機能の解明やバイオ医薬品の開発など、学術的のみならず産業的にもその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： Nanodiscs are self-assembled discoidal nanoparticles composed of scaffold lipoproteins that wrap themselves around the circumference of a lipid bilayer. It is generally accepted that nanodiscs are the simplest models of high density lipoprotein (HDL) particles that play a crucial role in reverse cholesterol transport (RCT). Nanodiscs have thus attracted considerable attention not only as a new class of potential therapeutic agents to enhance the RCT pathway but also as a useful platform capable of packaging membrane proteins.

In this study, we succeeded in controlling the size of nanodiscs using newly designed and synthesized surface-active peptides. It was also demonstrated that the peptides allow to produce the nanodisc reconstituted membrane proteins such as Acetabularia Rhodopsin II (AR II) and proteorhodopsin (PR) obtained by cell-free protein expression system in a single step.

研究分野：コロイド及び界面化学

キーワード：ナノディスク 膜タンパク質 界面活性型ペプチド リン脂質 脂質二分子膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノディスクとは、両親媒性ヘリックス構造を持つアポリポタンパク質が二分子膜状のリン脂質を包み込むように自己組織化したディスク状のナノ粒子である(図1)。生体内において、血中の余剰コレステロールを内部に可溶化して肝臓へと運搬する重要な役割を担っている。

近年、組換え技術によりアミノ酸配列を改変したアポリポタンパク質を用いて、ナノディスクが人工的に再構成されている。これらは、動脈硬化や脂質異常症を予防するバイオ医薬品のみならず、膜タンパク質に本来の膜環境を提供できる新たなナノ粒子として注目されている。しかしながら、現状のナノディスクは、大型の膜タンパク質(多量体など)を封入しにくいといった課題があった。

また、最近の無細胞合成系の発達により、大量の膜タンパク質をリン脂質二分子膜(リポソーム)中に埋め込んだ状態で作り出すことができるが、これをナノディスク化するためには、合成界面活性剤の添加が必要となり、膜タンパク質の不活性化が懸念されるなどの課題があった。

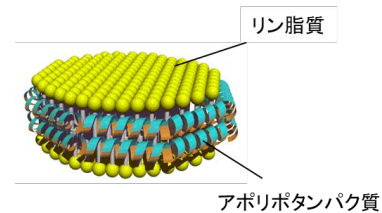


図1 ナノディスクの構造

2. 研究の目的

こうした背景の下、我々の研究グループでは、アポリポタンパク質ではなく界面活性型ペプチドを作り出し、膜タンパク質を失活させる懸念のある界面活性剤を添加せず、比較的大きなナノディスクを1段階で調製することに成功している。

本研究では、親水/疎水バランスの異なる各種界面活性型ペプチドを新たに設計・合成することにより、ナノディスクの形成や粒子径を制御し、これまで困難であった大型膜タンパク質やその多量体を内部に自在に封入でき、かつその *in situ* 機能解析を実現する新規ナノディスクを創製することを目的とした。

3. 研究の方法

各種の界面活性型ペプチドは、複数のペプチドを同時に合成することが可能な全自動パラレルペプチド合成装置(Syro I)を用い、Fmoc固相合成法により合成した。これを分取液体クロマトグラフィー(Prep-HPLC)により分離・精製した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-TOF MS)により同定した。なお、マトリックスにはシナピン酸を用いた。

ナノディスクの前駆体となるリポソームは、Bangham法により調製した。まず、L- α -ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DMPC)を試験管に秤量し、そこにクロロホルムを加えて溶解した。さらに、試験管内に窒素ガスを吹き付け、クロロホルムを除去することにより、試験管壁に脂質フィルムを作製した。これに所定量のリン酸緩衝液(pH 7.4)を加え、ボルテックスで攪拌することで、リポソーム溶液を得た。これに所定量の界面活性型ペプチドを添加し、ボルテックス処理後、25℃で一昼夜インキュベーション(1000 rpm)することでナノディスクを調製した。

4. 研究成果

親水/疎水バランスが異なる数十種類の界面活性型ペプチドを独自に設計し、全自動パラレルペプチド合成装置を用いて固相合成した。樹脂から切り出した各種の粗ペプチドをPrep-HPLCにより分離・精製した後、MALDI-TOF MSで分析したところ、それぞれのペプチドのプロトン付加体の分子イオンピークが確認された。さらに、これらのペプチドを

スクリーニングしたところ、特定の配列のペプチドが極めて高い界面活性を発現することが分かり、このペプチドを用いて新規ナノディスクの調製を試みた。

これまでナノディスクの粒子径は、アポリポタンパク質の長さ主に依存していたが、ペプチドに対するリン脂質の組成を変化させることで、ナノディスクの粒子径のコントロールすることを検討した。まず、DMPC と界面活性型ペプチドの組成を 5 : 1 から 60 : 1 まで変化させてナノディスクを調製した。目視観察の結果から、5 : 1 から 30 : 1 の組成までは、界面活性型ペプチドは、速やかに DMPC リポソームを可溶化することが判明した。一方、これ以上の組成になると、濁度の低下が認められたものの溶液は白濁しており、粒子径の大きなリポソームが共存することが示唆された。

次に、可溶化が確認された各種溶液を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析や動的光散乱 (DLS) 測定により評価した。得られた流体力学的直径と DMPC/ペプチド比との関係を、図 2 に示す。既存のアポリポタンパク質 A-I から形成されるナノディスクの粒子径は、8 nm から 16 nm 程度であったが、本研究の界面活性型ペプチドを用いることによって、最大 22.5 nm の粒子径のナノディスクを調製することに成功した。

さらに、図より明らかなように、DMPC/ペプチド比に依存して、粒子径は 10.0 nm から 22.5 nm まで直線的に変化することも分かった。これはリン脂質の増加に伴い、界面に配向するペプチドが減少することで、粒子径が大きくなるためと考えられる。また、ネガティブ染色法透過型電子顕微鏡 (NS-TEM) により、複数のディスク状のナノ粒子が観測された。これらの結果から、界面活性剤を利用することなく、比較的大きな膜タンパク質をナノディスク中に内包することが可能であるものと考えられる。

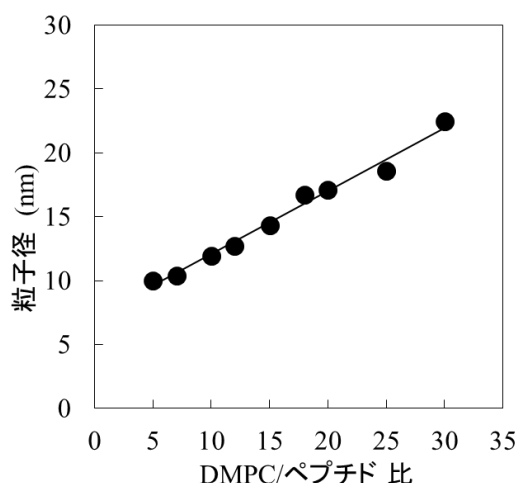


図2 ナノディスクの粒子径とDPPC/ペプチド比との関係

次に、無細胞合成によって DMPC リポソーム中に発現させた膜タンパク質である *Acetabularia Rhodopsin II* (AR、 35\AA) の一段階でのナノディスク中への再構成を試みた。なお、AR を内包した DMPC リポソームの形成は、位相差光学顕微鏡により確認した。AR を発現した DMPC リポソームに臨界面合体形成濃度 (CAC) 以上の界面活性型ペプチドを添加すると、速やかな濁度の低下が認められた。

次に、ペプチドの検出波長である 280 nm に加えて、AR の検出波長である 530 nm において、この溶液をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析した。その結果、ペプチド及び AR のいずれも、保持時間 30.1 分 (流体力学的直径 14.6 nm) の位置にピークが得られた。さらにこの溶液を、NS-TEM を用いて観察したところ、15 nm から 20 nm

程度のディスク状の粒子が多数確認された。さらに、少なくとも 50 個の粒子をランダムに抽出して算出したナノディスクの楕円長軸の平均長さは、 17.5 ± 13.6 nm であった。

なお、この条件では AR が含まれていないナノディスクの流体力学的直径は、12.0 nm であったことから、AR の内包によりナノディスクは、粒子径が増大したものと考えられる。また、紫外可視吸収スペクトル測定からも、ナノディスク内部への AR の内包や活性が確認された。

さらに、無細胞合成によって DMPC リポソーム中に発現させた 5 量体の膜タンパク質である proteorhodopsin (PR、 84\AA) についても、ナノディスク中への再構成を試みた。PR を発現させた DMPC リポソームに臨界面合体形成濃度 (CAC) 以上の本研究の界面活性型ペプチドを添加すると、AR の場合と同様に、速やかな濁度の低下が認められた。

PR の検出波長である 470 nm を用い、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析したところ、ペプチド及び PR のいずれも、保持時間 31.3 分 (流体力学的直径 13.1 nm) の位置にピークが得られた。さらに、NS-TEM を用いて観察したところ、ディスク状の粒子が多数確認され、ナノディスクの楕円長軸の平均長さは、 14.1 ± 3.8 nm であった。

また、諸条件を最適化することによって、一つのナノディスク中に一つの AR や PR を内包させることも可能であることが見出された。さらに、ナノディスク中に内包させたこうした膜タンパク質の核磁気共鳴 (NMR) 測定や高分解透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察についても試みた。

以上の結果から、本研究では、独自に設計・合成した界面活性型ペプチドを用いることで、これまで困難であったナノディスクの粒子径を制御することに成功した。さらに、無細胞合成によってリン脂質二分子膜中に発現させた *Acetabularia Rhodopsin II* (AR II) や proteorhodopsin (PR) などの多量体膜タンパク質を、界面活性剤などの余計な添加物を使用することなく、その活性を維持したまま、一段階でナノディスク中に再構成できることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① 井村知弘、ペプチドベース界面活性剤の特性と応用、オレオサイエンス、vol.17、2017、pp443-447. (査読なし)

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① Tomohiro Imura, Yuri Ikeda, Design and Synthesis of α -Helical Amphiphilic Peptides Leading to Lipid Nanodisc Formation, the 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference (PepCon-2017)、2017 年 (招待講演)

山本 柊成、平 敏彰、酒井健一、酒井秀樹、井村 知弘、両親媒性抗菌モデルペプチドによるナノディスクの創製、第 69 回 コロイドおよび界面化学討論会、2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：保坂 俊彰

ローマ字氏名：Toshiaki Hosaka

所属研究機関名：国立研究開発法人 理化学研究所

部局名：ライフサイエンス技術基盤研究センター

職名：研究員

研究者番号 (8 桁): 40462725

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。