

令和元年6月13日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19353

研究課題名（和文）界面活性剤フリー膜タンパク質解析のための生体膜ナノディスク

研究課題名（英文）Development of biomembrane nanodisc for detergent-free analysis of membrane proteins

研究代表者

安原 主馬（YASUHARA, Kazuma）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：90545716

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）：細胞膜は、脂質二分子膜と膜タンパク質が協働することで、単なる隔壁としてのみならず、生命機能に不可欠な多くの役割を担っている。本研究では、天然の細胞膜環境を再現した膜タンパク質解析の新たなプラットフォームとして、ディスク状の脂質二分子膜を自己組織化によって自発的に形成するポリマーを開発する事を目的とした。本研究で開発したポリマーは、脂質二分子膜の断片化を誘導し、直径数十ナノメートルのディスク状分子集合体（ナノディスク）を自発的に形成することができる。このナノディスクは新しい生体膜モデルとして、膜タンパク質や膜に作用するペプチドの構造・活性評価に利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きるために不可欠な多くの機能を担う生体膜は、近年では創薬ターゲットとしても注目を集めている。本研究で開発したナノディスクは、生体膜機能を分子レベルで理解することができる新たな分子ツールを提供することができる。ナノディスクを利用することで、これまでに未知であった多くの膜タンパク質や膜作用性ペプチド等の生理活性分子と生体膜との相互作用が明らかになることが期待される。従って本研究で開発したナノディスクは、基礎生物学分野での利用のみならず、創薬・医療・バイオテクノロジーと幅広い応用展開が期待される基礎技術である。

研究成果の概要（英文）：Cell membranes play important roles in various cellular functions, which are realized by the interplay of a lipid bilayer and membrane proteins. We have investigated the self-assembly based fabrication of lipid bilayer nanodiscs by designed membrane-active amphiphilic polymers to provide a prospective molecular platform for membrane protein solubilization. The designed polymer was found to spontaneously form lipid bilayer nanodiscs with a diameter of several tens-of-nanometers through the fragmentation of lipid membranes. This new class of nanodisc can be used as a model biomembrane, which can contribute to analyzing the structure and the function of membrane proteins as well as membrane-active peptides.

研究分野：生物物理学・界面化学・高分子化学

キーワード：膜タンパク質 脂質二分子膜 両親媒性ポリマー ナノディスク 自己組織化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、単なる隔壁としてのみならず物質輸送、シグナル伝達、エネルギー変換といった生命機能に欠かすことのできない様々な役割を担っている。これらの機能は、脂質二分子膜と膜タンパク質が複合化し、互いに連携することで実現している。また、多くの疾病が膜タンパク質の機能と関連していることが知られており、近年では創薬ターゲットとしても膜タンパク質が重要視されている。一方で、その取り扱いの困難さから、膜タンパク質の構造や機能に関する理解は、他の水溶性タンパク質と比較して大きく遅れているのが実情である。膜タンパク質の表面は疎水性のアミノ酸残基に富んでおり、脂質膜中に存在する場合においてのみ構造を維持することができる。すなわち、単に脂質膜から水溶液へ膜タンパク質を取り出すだけでは、高次構造を維持することができず、失活を招く。したがって、膜タンパク質の構造や機能を解析するためには、細胞膜と同様の環境を再現することが重要である。

これまで、界面活性剤ミセルやリポソーム、バイセルといった疎水性のコアを有する分子集合体を用いることで膜タンパク質を水溶化し、機能および構造の解析がなされてきた。これらの手法においては、対象となるタンパク質が限定されており、しばしば膜タンパク質の変性と失活を招くことが知られている。従って、細胞膜の担う多様な生命機能を理解するためには、膜タンパク質を天然の生体膜に存在する状態のままでも簡便かつ安定に水溶液中で取り扱える新しい手法を開発することが求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、天然の細胞膜環境を再現した膜タンパク質解析の新たなプラットフォームとして、生体膜ナノディスクを自己組織化によって自発的に形成するポリマーを開発する事を目的とした。具体的には、(i)生体膜の断片化および(ii)形成したナノディスク構造の安定化という2つの機能を単一の分子で実現する膜活性ポリマーの開発を実施した。ナノディスク形成に合成高分子を用いることで、容易に構造バリエーションを付与することが可能であり、かつ安価に大量合成が可能である。本手法が実現すれば、膜タンパク質の変成を招く界面活性剤の使用が不可欠であったこれまでの手法に取って代わり、膜タンパク質が細胞膜にあるがままの状態の評価することが可能な革新的技術となることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1)ナノディスクを形成するポリマーの分子ライブラリ構築

細胞膜を自発的に断片化し、ナノディスクを形成するポリマーの分子設計指針を明らかにするため、両親媒性ポリマーのライブラリを構築した。ここでは、ポリメタクリレートを基本骨格とし、親水性側鎖としてコリン基を、疎水性側鎖としてブチル基を導入したランダム共重合体(図1)の合成を行った。ライブラリ化にあたって、親水性および疎水性モノマーユニットの組成比( $f$ )および重合度( $n$ )を構造因子として変化させたポリマーを合成し、得られたポリマーは<sup>1</sup>H NMRによって同定した。

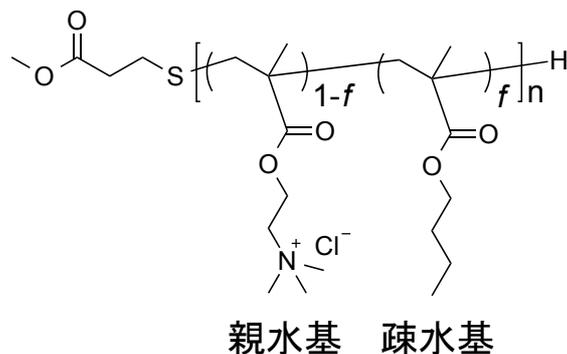


図1. 合成したナノディスク形成ポリマーの構造式

#### (2)ポリマーのスクリーニングとナノディスクの形成評価

(1)で得られたポリマーライブラリを対象として、膜の断片化活性およびナノディスクの形成を評価した。はじめに、1, 2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospholcholine (DMPC)を用いて形成されたリポソームに対してポリマーを添加した試料を対象として、濁度測定および動的光散乱(DLS)法による膜の断片化活性に関するスクリーニングを行った。続いて、高い膜の断片化活性を示したポリマーを対象として、透過型電子顕微鏡(TEM)によるポリマー-脂質複合体の形態評価、示差走査熱量測定(DSC)による膜物性の評価を行った。

#### (3)ナノディスクを用いた生理活性分子の評価

得られたナノディスクを用いて、膜と相互作用する生理活性ペプチドの作用評価を行った。具体的には、ヒト膵島アミロイドポリペプチド(hIAPP)およびアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )を対象として、アミロイド繊維の形成についてチオフラビンT(ThT)蛍光によって評価した。加えて、脂質膜に

結合したペプチドの高次構造について、円二色性(CD)スペクトルから評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ナノディスク形成ポリマーによる脂質膜の断片化と分子構造との相関

得られたポリマーを DMPC リポソーム分散液に添加すると、ポリマーの濃度に依存して濁度の顕著な低下が見られた(図 2a)。得られた混合試料の DLS 測定より、流体力学的直径( $D_{hy}$ )が数十ナノメートル程度の均一な粒子が形成されることを確認した(図 2b)。このことから、ポリマーによってリポソーム(粒径 200 nm)が断片化され、微小なポリマー-脂質複合体を自発的に形成することを確認した。この濁度低下および DLS による粒径評価を指標として、合成したポリマーライブラリのスクリーニングを行ったところ、脂質膜の断片化においては、適切な親疎水性バランス(モノマー組成比)および適切な分子量範囲が存在することがわかった。具体的には、 $f=0.4\sim 0.6$  程度、平均分子量  $3,000\sim 9,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  程度のポリマーが高い膜断片化活性を示すことが見いだされた。

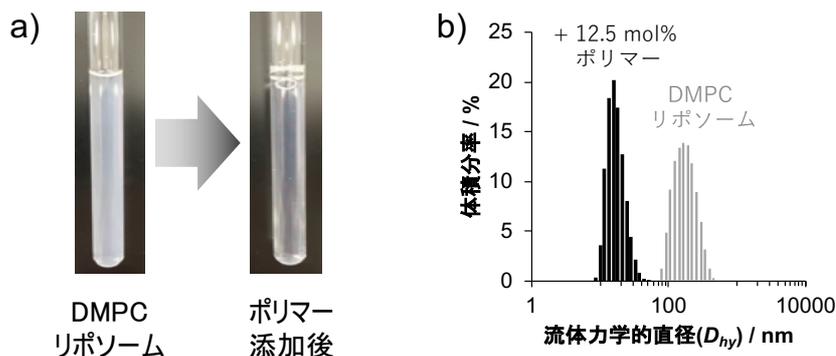


図 2. (a)ポリマーが誘導するリポソーム分散液の濁度減少と(b)DLS による粒径分布の評価

##### (2) 形成されたナノディスクの構造・物性評価

高い膜断片化活性を示したポリマーを対象として、TEM 観察によってポリマー-脂質複合体の形態観察を行った。DMPC とポリマーを 8:1 のモル比で混合した試料のネガティブ染色法および cryo 法による TEM 観察を行ったところ、直径  $10\sim 20\text{ nm}$  の均一なディスク構造が確認された(図 3)。ナノディスクの厚みは約  $5.5\text{ nm}$  であり、脂質二分子膜の厚みと対応することから、個々のナノディスクは単一の脂質二分子膜から形成されていることが明らかになった。また、ポリマーと脂質の混合比を変えることで、 $9\sim 22\text{ nm}$  の範囲でナノディスクのサイズを制御できることが確認されたことから、ディスクの周囲においては複数のポリマー分子が会合していることが示唆された。ポリマー添加量に依存したナノディスクのサイズ変化は  $^{31}\text{P}$  NMR 測定によっても確認されており、ナノディスクのサイズに依存して磁場への配向性が変化することがわかった。DSC 測定より、DMPC によって形成されたナノディスクは  $23^\circ\text{C}$  付近に吸熱ピークを示したことから、ナノディスクであってもリポソーム同様のゲル-液晶相転移を示すことが確認された。このことから、本研究で開発したポリマーは、脂質膜を直接断片化することで、二分子膜構造および膜物性を維持したままナノディスクを形成できることが明らかになった。

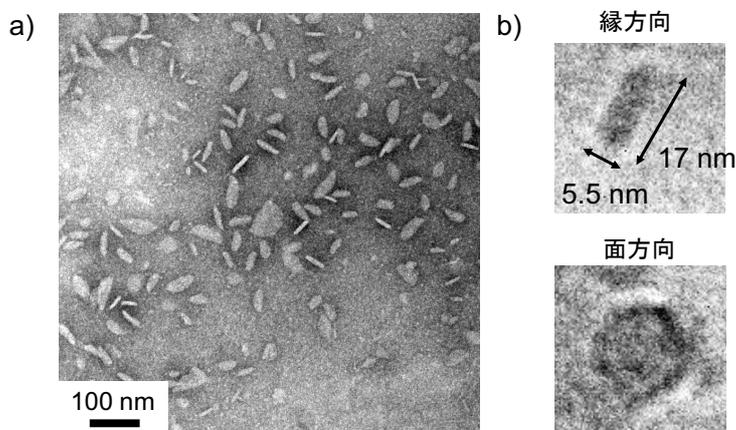


図 3. ナノディスクの(a)ネガティブ染色および(b)cryo-TEM 像

##### (3) ナノディスクと生理活性ペプチドの相互作用

本研究で開発したナノディスク形成ポリマーは、紫外・可視域に大きな吸収を有しないこと、また観察対象となる膜タンパク質やポリペプチドと共通する分子構造を有しないことから、各種分光法を直接適用できるという利点がある。ここでは、アミロイドタンパク質と脂質膜の相

相互作用について、ナノディスクを用いた評価を行った。hIAPP を対象として、ThT によるアミロイド繊維形成の評価を行ったところ、ナノディスク共存下において、アミロイド繊維の形成が顕著に抑制されることがわかった(図 4a)。また、CD スペクトル測定より、ナノディスクが存在することで  $\alpha$ -helix 構造が安定化されていることが確認された(図 4b)。このことは、ナノディスクに結合することのできる hIAPP の分子数がディスクのサイズによって限定されており、オリゴマー状態の hIAPP を安定に捕捉できることを反映していると考えられる。また、同様のアミロイド抑制効果は  $A\beta$  においても観察された。このことから、本研究で開発したナノディスクは新しい生体膜モデルとして、膜タンパク質や膜に作用するペプチドの構造・活性評価に利用できることが明らかになった。

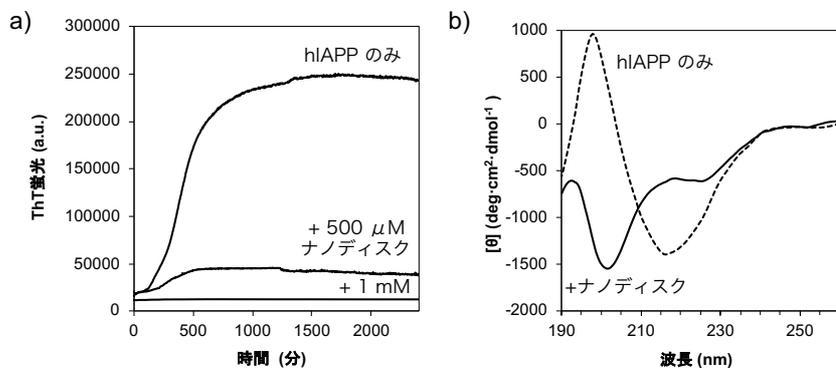


図 4. (a)ThT 蛍光による hIAPP 繊維形成の評価および(b)CD スペクトル

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 安原 主馬, 細胞膜機能を探る脂質ナノディスク –生きた膜タンパク質の解析を目指した新しいプラットフォーム, 化学と工業, 査読無, 2019, 72(3), 240-241.
- ② Bikash R. Sahoo, Takuya Genjo, Takahiro W. Nakayama, Andrea K. Stoddard, Toshio Ando, Kazuma Yasuhara, Carol A. Fierke, Ayyalusamy Ramamoorthy, A cationic polymethacrylate-copolymer acts as an agonist for  $\beta$ -amyloid and an antagonist for amylin fibrillation, Chemical Science, 査読有, 2019,10, 3976-3986.  
DOI: 10.1039/C8SC05771K
- ③ 安原 主馬, 脂質ナノディスクを自発形成する膜活性ポリマーのデザイン, C&I Commun, 査読無, 2018, 43, 29-31.
- ④ 安原 主馬, 両親媒性ポリマーによる脂質ナノディスクの形成とアミロイドタンパク質解析への応用, 日本化学会 生体機能関連化学部会 ニュースレター, 査読無, 2018, 33, 19-22.  
<http://seitai.chemistry.or.jp/newsletter/NL33-03%202018.12.15.pdf>
- ⑤ Bikash R. Sahoo, Takuya Genjo, Michael Bekier, II, Sarah J. Cox, Andrea K. Stoddard, Magdalena Ivanova, Kazuma Yasuhara, Carol A. Fierke, Yanzhuang Wang, Ayyalusamy Ramamoorthy, Alzheimer's amyloid-beta intermediates generated using polymer-nanodiscs, Chemical Communications, 査読有, 2018, 54, 12883-12886.  
DOI: 10.1039/C8CC07921H
- ⑥ Kazuma Yasuhara, Jin Arakida, Thirupathi Ravula, Sudheer Kumar Ramadugu, Bikash Sahoo, Jun-ichi Kikuchi and Ayyalusamy Ramamoorthy, Spontaneous Lipid Nanodisc Fomation by Amphiphilic Polymethacrylate Copolymers, Journal of the American Chemical Society, 査読有, 2017, 139(51), 18657-18663.  
DOI: 10.1021/jacs.7b10591

[学会発表] (計 9 件)

- ① 光好佑磨, 荒木田臣, Rapenne Gwenaël, 菊池純一, 安原主馬, 両親媒性ポリマーによる脂質二分子膜の断片化とナノディスク形成, 日本化学会第 99 春季年会, 2019.3,
- ② Y. Mitsuyoshi, J. Arakida, G. Rapenne, J. Kikuchi, K. Yasuhara, Design and characterization of lipid nanodisc-forming polymer, 1st G'L'owing Polymer Symposium in KANTO(国際学会), 2018. 12, Tokyo (Japan)
- ③ Y. Mitsuyoshi, J. Arakida, G. Rapenne, J. Kikuchi, K. Yasuhara, Design and Characterization of Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives for Lipid Nanodisc Formation, Macromolecular Science & Engineering 42nd Annual Symposium(国際学会) 2018.10, Ann Arbor, MI (USA)
- ④ K. Yasuhara, Biomimetic design of membrane-active functional amphiphiles Department of Materials Science and Engineering Seminar, Stony Brook University(招待講演), 2018.10, Stony Brook, NY (USA)

- ⑤ 安原主馬, 荒木田臣, 光好佑磨, 菊池純一, Ayyalusamy Ramamoorthy, Gwenaël Rapenne, 両親媒性ポリマーによる脂質膜ナノディスクの形成とアミロイドペプチドとの相互作用, 第12回バイオ関連化学シンポジウム 2018. 9, 大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)
- ⑥ 安原主馬, 荒木田臣, 光好佑磨, 菊池純一, Ayyalusamy Ramamoorthy, Gwenaël Rapenne, 両親媒性ポリマーによる脂質膜の断片化とナノディスク形成, 第69回コロイドおよび界面化学討論会, 2018. 9, 筑波大学筑波キャンパス(茨城県つくば市)
- ⑦ 安原主馬・荒木田臣・井上雅也・菊池純一 両親媒性ポリマーによる脂質ナノディスクの形成とアミロイドペプチドとの相互作用, 第28回バイオ・高分子シンポジウム, 2018. 7, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- ⑧ 安原主馬, 脂質膜の機能・構造を操る両親媒性分子のバイオミメティック・デザイン, 第36回 関西界面科学セミナー(招待講演) 2018. 7, 関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市)
- ⑨ 安原主馬・井上雅也・荒木田臣・菊池純一, 脂質ナノディスク形成のための膜活性ポリマーのデザイン 第55回生物物理学会年会(招待講演), 2017. 9, 熊本大学黒髪北地区 (熊本県熊本市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称 : LIPID NANODISCS FORMATION BY AMPHIPHILIC POLYMETHACRYLATE COPOLYMERS

発明者 : Kazuma Yasuhara 他

権利者 : 同上

種類 : 特許、US

番号 : 62/65849

出願年 : 2018年

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 塚崎 智也

ローマ字氏名 : (TSUKAZAKI, tomoya)

所属研究機関名 : 奈良先端科学技術大学院大学

部局名 : 先端科学技術研究科

職名 : 教授

研究者番号 (8桁) : 80436716

研究分担者氏名 : 安藤 剛

ローマ字氏名 : (ANDO, tsuyoshi)

所属研究機関名 : 奈良先端科学技術大学院大学

部局名 : 先端科学技術研究科

職名 : 准教授

研究者番号 (8桁) : 60324654

※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。