

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22493

研究課題名（和文）新規リン脂質様可溶化剤を用いた膜タンパク質の高分解NMR構造解析

研究課題名（英文）High resolution NMR structure determination of membrane proteins using novel phospholipid analogs

研究代表者

松崎 勝巳（Matsuzaki, Katsumi）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00201773

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）：膜タンパク質の高分解能NMR測定を目指し、脂質二分子膜環境を提供し、かつ小サイズで膜タンパク質を可溶化できるリン脂質ベースの新規可溶化剤と安定化剤を開発した。この2種を組み合わせることで、7回膜貫通型膜タンパク質であるバクテリオロドプシンや1回膜貫通型膜タンパク質であるA型インフルエンザM2タンパク質を、40℃で1週間程度、安定に可溶化することに成功した。さらに、2H-15N標識バクテリオロドプシンの1H-15N TROSY-HSQCスペクトル測定を行ったところ、観測しうる残基数のおおよそ8割強のピーク数が観測できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬に重要な膜タンパク質は水に溶けないため、その構造機能解析は遅れている。これまでに用いられている膜タンパク質可溶化剤は、膜タンパク質を変性させてしまうことが多いという問題点を抱えていた。我々は、膜タンパク質のまわりに本来存在するリン脂質をベースとした新規化合物を開発することにより、膜タンパク質を長期に安定に可溶化することに成功し、構造機能解析への道を拓いた。

研究成果の概要（英文）：We have developed two novel phospholipid analogs that provide lipid bilayer environments and can solubilize and stabilize membrane proteins with small sizes for structural determination by high resolution NMR. A combination of the two compounds, the 7 times-transmembrane protein bacteriorhodopsin and the single transmembrane protein M2 protein of the type A influenza virus could be stably solubilized for a week at 40 °C. Furthermore, the 1H-15N TROSY-HSQC spectra of 2H 15N-labeled bacteriorhodopsin gave approximately 80% of theoretically observable peaks.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜タンパク質 高分解能NMR 可溶化剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの薬物の標的である G タンパク質共役型受容体(GPCR)を含む膜貫通型タンパク質分子の構造解析手法は現在限られる。X 線結晶構造はとりうる構造の「スナップショット」に過ぎず、膜中ではより動的に構造変化すると考えられているため、膜環境での測定も必須である。溶液 NMR 法では構造変化ダイナミクス測定が可能であるが、立体構造が決定可能な分子量は最大で 80 kDa 程度に制限される。リポソーム、ナノディスク等の既存の脂質膜環境はこの分子量よりはるかに大きいいため、分子量 50 kDa 程度の GPCR の立体構造決定は不可能である。次善の策として界面活性剤ミセル中に可溶化した場合も、十分小さいサイズは得られず、しかも変性することが多い。この現状を解決し、膜タンパク質 NMR 測定にブレークスルーをもたらすには、生体膜を構成するグリセロリン脂質の部分構造を持ち、かつ高分解能 NMR に適した小さいサイズの膜タンパク質-脂質複合体を形成するような新規可溶化剤が切望されている。

研究代表者はこれまでに、二分子膜と似た配向で膜タンパク質周囲を覆い可溶化できるようなデザインを持つリン脂質ベースの可溶化剤 Cholyl-PC とその誘導体 Cholyl-PC di-sulf (安定化剤) を組み合わせることで、7 回膜貫通型タンパク質であるバクテリオロドプシン(bR)(27 kDa)を、わずか約 20 分子のリン脂質誘導体で小サイズで、安定に可溶化できることを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、この新規可溶化剤組成物の膜タンパク質構造解析への有用性を実証するため、bR のほかに、A 型インフルエンザ M2 タンパク質の発現、可溶化に挑戦し、高分解能 NMR や CD 測定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン脂質誘導体の合成

すでに確立した方法に従い、Cholyl-PC および Cholyl-PC di-sulf の化学合成を行った。

(2) bR の調製と NMR 測定

bR は、高度好塩菌から調製した紫膜を X で可溶化した後、Y を添加して安定化した。NMR 測定用安定同位体標識 bR は、celtone base powder (D, 97%+; 15N, 98%+) 含有培地を用いて調製した紫膜を用い、同様に可溶化・安定化した後、限外濾過により濃縮した。5% D2O を添加し、950 MHz 核磁気共鳴分光器を用いて、40°C で 10 時間 [¹⁵N, ¹H] TROSY-HSQC スペクトル測定を行った。

また、透過型電子顕微鏡により、ネガティブ染色した可溶化 bR のサイズを測定した。

(3) M2 の調製と CD、NMR 測定

N 末端に His タグを付加し、19 番目と 50 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した His-M2 (C19S, C50S) は、大腸菌発現系により発現させ、大腸菌破碎液から M2 を EMPIGEN で溶出し、Ni 樹脂を添加し、**Cholyl-PC** を含む imidazole 含有 buffer で溶出した。次に、TEV プロテアーゼにより His タグを切断し、再度 Ni 樹脂精製を行った。その後、**Cholyl-PC di-sulf** を添加して限外濾過により濃縮した。40°C で 1 週間、経時的に CD スペクトル測定を行った。また、アマンタジン添加前後で、600 MHz 核磁気共鳴分光器を用いて、37°C で 7 時間 ¹H NMR スペクトル測定を行った。

4. 研究成果

(1) bR の NMR 測定

透過型電子顕微鏡観察により、**Cholyl-PC** と **Cholyl-PC di-sulf** を組み合わせることにより、NMR 測定に用いられる高濃度 ([bR] = 約 150 microM、[リン脂質誘導体] = 約 0.2 mM) でも、直径約 5 nm の小さなサイズで bR を可溶化できることが明らかとなった。また、[¹⁵N, ¹H] TROSY-HSQC スペクトルを測定したところ、195 個のピーク数を検出できた。bR は 248 残基であり、また ¹H-¹⁵N ピークとして検出できないプロリン残基が 11 個存在することを考えると、8 割以上のピーク数である。これは DDM や amphipol、nanodisc 中における結果と同等以上の結果であると言える[1][2]。ピークを得ることのできなかった残基がある原因としては、特にヘリックス中心部に存在するアミドプロトンが重水素から軽水素に交換されにくく、十分な ¹H シグナルを出すことができなかったためであると考えられる。

(2) M2 の調製と CD、NMR 測定

様々な変異発現タンパク質、ベクター、コドン最適化を検討したところ、大腸菌 1 L 培養あたりで 264 nmol の His-M2 (C19S, C50S) が得られた。種々の M2/リン脂質誘導体比で可溶化した M2 を 40° C で 1 週間インキュベートしながら経時的に CD スペクトルを測定したところ、いずれの条件でも CD スペクトルの変化はみられなかったが、10 μM M2/1 mM リン脂質誘導体のとき、もっとも高い helicity (27%) が得られた。この値は、予想値 31% に近いものであった。次に、この条件で、溶液 NMR 測定により、M2 のリガンドであるアマンタジンの結合性を評価した。インキュベート前後とも、M2 に由来する ¹H NMR スペクトル全体では、アマンタジン添加前、アマンタジン終濃度 100 μM、200 μM において顕著な変化が見られなかったが、7.9 ppm 付近と 8.05 ppm 付近において、アマンタジン濃度の変化に伴いスペクトルの変化が見られた。以上のことから、アマンタジンが可溶化 M2 (C19S, C50S) の特定の残基と特異的に結合したことが示唆された。すなわち、本法で可溶化した M2 は、40° C で 1 週間、本来の構造をとっていたといえる。

<引用文献>

- [1] M. Schubert, M. Kolbe, B. Kessler, D. Oesterhelt, P. Schmieder: (2002) *ChemBiochem* 10, 1019–1023.
- [2] M. Etzkorn, T. Raschle, F. Hagn, V. Gelev, A. J. Rice, T. Walz, G. Wagner : (2013) *Structure* 3, 394–401.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|---------------------------------|--|-----------------------|
| 産業財産権の名称 新規なステロイド化合物 | 発明者 松崎 勝巳、矢野 義明、高木 麻衣、 山岡 庸介、高須 | 権利者 国立大学法人京 都大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-039999 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|-----------------------------------|--|-----------------------|
| 産業財産権の名称 新規なステロイド化合物 | 発明者 松崎 勝巳、矢野 義明、高木 麻衣、 山岡 庸介、高須 | 権利者 国立大学法人京 都大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/6968 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 矢野 義明 (Yano Yoshiaki) (60402799) | 京都大学・薬学研究科・講師 (14301) | |
| 研究 分 担 者 | 星野 大 (Hoshino Masaru) (70304053) | 京都大学・薬学研究科・准教授 (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 |
|---------|---------|