

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310142

研究課題名（和文） 大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新規糖脂質の構造と機能の解析

研究課題名（英文） Function and structure of novel glycolipid essential for membrane protein integration

研究代表者

島本 啓子（SHIMAMOTO KEIKO）

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機化学研究所・主幹研究員

研究者番号：70235638

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質の細胞膜への挿入は、全ての生物に共通の重要な過程である。我々は、大腸菌の膜タンパク質挿入に必須の因子として、活性を指標に内膜から MPIase (membrane protein integrase) を単離し、化学構造を明らかにした。その酵素様活性からの予想に反して、MPIase はタンパク質の構造を持っておらず、3種のアミノ糖から成るユニットが10回程度繰返す糖鎖部とジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した新しい糖脂質であった。構造活性相関研究から、活性には糖鎖部が重要であり、糖鎖部がシャペロンとしてはたらく機構が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have found a novel integration factor in the inner membrane of *E. coli*, naming it MPIase (membrane protein integrase). MPIase turned out to be a glycolipid composed of diacylglycerol and a glycan chain of three acetylated aminosugars linked through pyrophosphate. Hydrolytic removal of the lipid moiety gave a soluble product with higher integration activity than that of the original MPIase. This soluble form of MPIase directly interacts with a newborn membrane protein, maintaining its integration-competent structure, and allowing its post-translational integration into membranes. Thus, MPIase possesses integration-dedicated chaperone-like activity toward membrane proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
23年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
24年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1) 糖脂質、(2) 膜タンパク質、(3) 糖鎖、(4) 生体膜、(5) 膜挿入、(6) 構造決定
(7) 有機合成、(8) 生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

膜内在性タンパク質（膜タンパク質）は、多くの受容体、トランスポーター、チャネル

ル、酵素を含み、生命維持に不可欠の機能を有している。膜タンパク質は、膜中で決まった構造をとって初めてその機能が発現する

ため、その合成過程において正しく膜内に挿入される必要がある。膜タンパク質の膜挿入機構については未だ不明な点が多く、モデル生物として大腸菌の膜蛋白挿入機構を理解することは、ヒトをはじめとする高等生物の生命現象を理解する上で非常に重要である。連携研究者の岩手大学（研究開始当時：東京大学）の西山らは、リポソーム上に既存のトランスロコンを全て再構成しても膜挿入活性が再現できないことから、大腸菌内膜には膜挿入反応に関わる未知の因子が存在すると報告した。

2. 研究の目的

この新因子の構造が明らかになり、純粋に入手できるようになれば、膜タンパク質が膜挿入する際の分子機構の詳細が解明されるばかりでなく、正しい構造をもつ膜タンパク質の再構成が可能になり、機能未知の膜タンパク質の機能解析や大量発現にも貢献すると考えた。本研究では、この新因子の構造を決定し、膜やタンパク質との相互作用を調べることで、その活性発現機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MALDI-MS、NMR などの結果から、因子の分子量は約 8 千の糖脂質であると推定した。まず構成糖、還元末端側ユニットの候補化合物を合成し、天然物の分解物と比較することで、糖鎖部の構造決定を行った。次いで、その構造を基に部分構造を合成して基本ユニット構造を確認した。また、酵素や化学分解により膜挿入活性を有する最小構造を求めた。

4. 研究成果

MPIaseの構造解析

大腸菌内膜に存在するタンパク質うちの一部は、生合成後にトランスロコンを介さずに膜挿入されるため、膜の脂溶性による「自発的挿入」であると考えられてきた。しかし、生理的濃度のジアシルグリセロール (DAG) により自発的挿入を完全に抑制したりポソームでは膜挿入は起こらない。西山らはさらに、トランスロコンを除去した大腸菌内膜の抽出物をリポソームに再構成すると、膜挿入

が復活することを見出した。これらの結果は、大腸菌の内膜には、タンパク質膜挿入に関わる未知の因子が存在するという可能性を示している。そこで、我々は西山らと共同で、膜挿入活性を指標に、各種クロマトグラフィーを組み合わせることにより、大腸菌内膜から新規因子を単離精製し、その機能から MPIase (Membrane Protein Integrase) と命名した。MPIase はトランスロコン依存性・非依存性どちらの経路にも必須の因子であった。

大腸菌内膜から精製した MPIase を組成分析した結果、MPIase にはアミノ酸が全く存在しなかった。一方で、グルコサミンとともに大量のアンモニアが検出されたことから、酸加水分解に不安定なアミノ糖を有していると推察した。さらに、加水分解物の GC-MS では大腸菌に一般的な脂肪酸やグリセロールが観測された。これらの結果から、MPIase は非タンパク質性の糖脂質であると推測された。MPIase の $^1\text{H-NMR}$ や $^{13}\text{C-NMR}$ で *N*-アセチル基や脂質のピークが同定されたことから、糖脂質の構造が裏付けられた (図 1a)。一方、 $^{31}\text{P-NMR}$ を測定したところ、2 本の特徴的なピークを示し、ピロリン酸ジエステルの存在が示唆された (図 1b)。一方のリン酸基に糖アノマープロトンとの相関が認められたため、このピロリン酸は糖鎖と脂質部位のリンカーになっていると考えた。

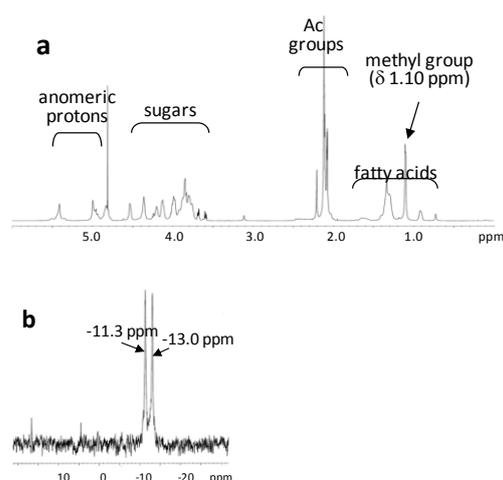


図1 MPIaseのNMR a) $^1\text{H-NMR}$ は糖脂質構造をサポートする。b) $^{31}\text{P-NMR}$ の化学シフトからピロリン酸ジエステルの存在が分かる。

続いて、MPIase の MALDI-TOF-MS を測定したところ、図 2a のように 650 または 608 という質量差をもつ特徴的な繰り返しパターンが得られた。608 を親イオンとして MS/MS を行うと、187, 203, 217 の 3 つの成分から構成されていた (図 2b)。組成分析の結果を踏まえると、203 は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に由来することが分かる。650 を親イオンとする MS/MS 解析では、203 に代わって 245 の成分が観測され、42 の質量差は GlcNAc のアセチル基の修飾の有無によるものと推測された。NMR の積分比から約 1/3 がアセチル化されていると見積もっている。残る 2 つの成分は、*N*-アセチルアミノヘキソースとの質量数差から、そのデオキシ糖とウロン酸であると予測した。NOESY でデオキシ糖の 6 位と思われるメチル基と強い NOE を持つアミド基が存在することから、デオキシ糖としては 4-アセトアミドフコース (D-Fuc4NAc) を想定し、標品を合成して GC-MS で確認した。ウロン酸についても、数種類を合成して GC-MS を比較し、*N*-アセチルマンノサミンウロン酸 (D-ManNAcA) と同定した。MPIase の糖鎖は、これら 3 糖から成るユニットが繰り返す構造と考えられる。図 2a で見られた不均一性は脂質部や糖の *O*-アセチル基の有無の多様性に由来するため、アルカリ処理や HF 処理をすると、より単純な 608 Da 間隔の繰り返しパターンに変化し、繰り返し数は 9~11 回程度であると明らかにすることができた。(図 2c)。次いで、糖鎖の配列と結合位置

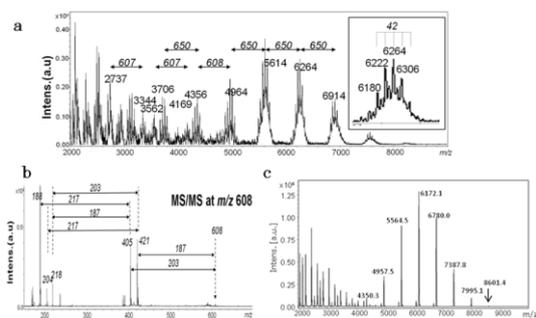


図 2 MPIase の MALDI-TOF-MS 分析 a) MPIase は特徴的な繰り返しパターンを示す。42 の質量差はアセチル基の有無の多様性があることを示唆する。b) m/z 608 を親イオンとする MS/MS 解析により 3 つの成分で構成されていることが分かる。c) アルカリ処理後の MPIase の MALDI-TOF-MS。O-アセチル基と脂肪酸が除去されて単純なパターンを示す。

を解析した。糖鎖成分を水素化ホウ素ナトリウムで還元処理してから加水分解し、GC-MS で標品との比較分析を行い、還元末端の糖が GlcNAc であることを決定した。二次元 NMR からは、Fuc4NAc と ManNAcA の結合は推定できたが、GlcNAc がどちらの糖に繋がっているのかを決めることができなかった。また、ManNAcA のアノマー位の立体も決められなかった。そこで、推定部分構造を合成し、 ^{13}C -NMR のケミカルシフト値を天然物と比較して、3 糖ユニットは α -Fuc4NAc-(1 \rightarrow 4)- β -ManNAcA-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNAc(1 \rightarrow 3) であると結論した。以上の情報を総合し、MPIase の構造をを図 3 のような糖脂質であると決定した。

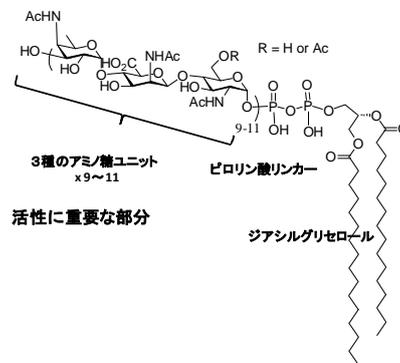


図 3 MPIase の構造

MPIase の機能

MPIase を酵素や化学反応により誘導体化したものについて、Sec 因子非依存性の膜挿入活性を調べたところ、驚いたことに、脂質部分が無い糖鎖誘導体に天然物より強い挿入活性が見られた。ゲルろ過の結果から、水溶性の糖鎖部は 8 量体程度の大きさの複合体を形成していることが示唆された。さらに、この複合体が膜タンパク質を可溶化して凝集を防いでいる可能性が考えられた。他の細胞質内成分にも弱い凝集抑制作用はあったが、膜挿入活性は全く観測されなかったことから、MPIase の作用は単なる可溶化だけでは説明できず、膜挿入能をもつシャペロン様の活性であると考えられる。我々は、図 4 のように、MPIase の糖鎖部が複合体を形成し、リボゾームから翻訳されてくる合成直後のタンパク質を捕捉し、膜に挿入できる構造に

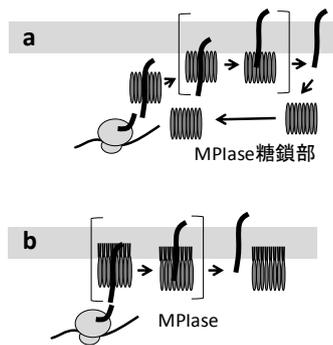


図4 推定される挿入機構：a)糖鎖部は会合しており、リボソームから翻訳されてくるタンパク質を捕捉して凝集を防ぎ、挿入可能な構造を維持する。膜にターゲットする過程([]内)は推定。b)天然型MPIaseも同様に膜上で会合し、タンパク質を捕捉する機構が推定される。

変換するという機構を推定している。水溶性の糖鎖誘導体の場合は、タンパク質の受け取り効率が上がったために高い活性を示したのであろう。これまでタンパク質の膜挿入過程に非タンパク質性の有機分子が関与する知見はなく、膜挿入機構解明に大きな手がかりを与えることができたと考えている。また、非タンパク質性の糖脂質が酵素(integrase)様の機能を示すことは極めて興味深く、我々は glycolipozyme という概念を提案した。糖鎖-タンパク質相互作用や糖鎖複合体から膜にタンパク質が受け渡される過程など、まだ詳細は解明できておらず、今後の課題であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

A novel complete reconstruction system for membrane integration of the simplest membrane protein. Nishiyama K., Maeda M., Abe M., Kanamori T, Shimamoto K., Kusumoto S., Ueda T., and Tokuda H., *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **394**, 733-736 (2010). 査読有

MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. Nishiyama K., Maeda M., Yanagisawa K., Nagase R., Komura H., Iwashita T., Yamagaki T., Kusumoto S.,

Tokuda H., Shimamoto K.

Nature Communications, **3**:1260, DOI: 10.1038/ncomms2267 (2012). 査読有

[学会発表] (計8件)

第53回天然有機化合物討論会 9.27-29 (2011) (大阪) 膜タンパク質挿入に関わる新規糖脂質の機能と構造 前田、西山、永瀬、岩下、小村、徳田、楠本、島本 要旨集 p1-6

第84回日本生化学会大会 9.21-24 (2011) (京都) タンパク質膜挿入に関与する新規複合糖脂質 MPIase の構造と機能 西山、前田、島本、楠本、徳田 4P-0276

第14回生命化学研究会～in cell interactions を調べる・動かす・くみ上げる 12.3 (2011) (和歌山) 大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新しい因子：機能と構造 島本、前田、永瀬、楠本、西山

日本化学会第92春季年会 3.25-28 (2012) (横浜) 大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新規糖脂質 MPIase の合成研究 永瀬、島本、前田、楠本、西山 4E2-09

新規素材探索研究会 6.8 (2012) (横浜) 大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新しい因子：機能と構造」島本、前田、永瀬、楠本、西山 要旨集 p6

第31回日本糖質学会年会 9.17-20 (2012) (鹿児島) 大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新しい因子 MPIase の機能と構造 島本、前田、永瀬、柳澤、徳田、西山、楠本 要旨集 p112

Structure and Function of Novel Glycolipid Characterized as Membrane Protein Integrase 科研費新学術領域「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」第1回国際領域シンポジウム 10.31～11.1 (京都) 島本、前田、永瀬、柳澤、徳田、西山、楠本 要旨集 なし

「膜タンパク質挿入の鍵を握る糖脂質」 未来を拓く有機化学 ―新方法論と新戦略の創成― 2.23 (神戸) 島本 要旨集 p.12

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：大腸菌膜タンパク質挿入因子
発明者：島本啓子、楠本正一、前田将秀、西山賢一、徳田元、上田卓也、金森崇
権利者：公益財団法人サントリー生命科学財団
種類：特許
番号：PCT/JP2011/055026
出願年月日：2011.3.4
国内外の別：PCT

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島本 啓子 (SHIMAMOTO KEIKO)
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・主幹研究員
研究者番号：70235638

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

西山 賢一 (NISHIYAMA KEN-ICHI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：80291334

三浦 (野村) 薫

(MIURA-NOMURA 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・研究員
研究者番号：90353515

楠本 正一

(KUSUMOTO SHOICHI)
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・元所長
研究者番号：30028253