

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650053

研究課題名(和文)膜タンパク質の新たな解析プラットフォームをつくる

研究課題名(英文)Development of novel platforms for membrane protein analysis

## 研究代表者

安原 主馬 (Yasuhara, Kazuma)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：90545716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は、細胞膜における機能モジュールであり、種々の重要な細胞機能を担っている。本研究では、脂質二分子膜構造を有する安定なナノディスクの開発を行うことで、従来解析が困難であった膜タンパク質の新たな解析プラットフォームを構築することをめざした。本研究で新たに開発した両親媒性分子は、脂質二分子膜の疎水性縁部と結合することで自発的にナノディスクの形成を誘導することができ、得られたナノディスクは、膜タンパク質の再構成マトリックスとして用いる事ができることが示された。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins embedded in cell membranes play various important roles in the cellular functions. In this study, we have developed stable lipid bilayer nanodiscs, which can be applied to a functional and structural analysis of membrane proteins. The membrane-active amphiphiles designed in this study spontaneously formed nanodiscs through the interaction with a hydrophobic edge of a lipid bilayer. It was demonstrated that obtained nanodisc has a potential as a novel matrix for the membrane protein reconstitution.

研究分野：界面物理化学

キーワード：膜タンパク質 脂質二分子膜 バイセル 自己組織化 有機-無機ハイブリッド

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、膜タンパク質と脂質二分子膜が複合化した超分子集合体であり、細胞を形づくるのみならず、高度な細胞機能を担うインターフェイスである。なかでも膜タンパク質は細胞膜における機能モジュールであり、エネルギー変換や物質輸送・シグナル伝達といった「生きる」ために不可欠な多くの細胞機能を担っている。また、近年では様々な疾病においても膜タンパク質の関与が指摘されていることから、創薬ターゲットとしても注目を集めている。しかし、その構造や機能についての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。これは、膜タンパク質は脂質膜に組み込まれたときにのみ構造が維持可能であり、水溶液中では容易に凝集・変成を引き起こすためである。したがって、膜タンパク質を天然の状態のままで簡便かつ安定に水溶液中で取り扱える手法が求められている。

従来の膜タンパク質の構造・機能解析においては、界面活性剤ミセルが広く一般的に用いられてきた。しかし、ミセルは細胞膜を構成する脂質二分子膜とは全く異なる球状の分子重合体であり、界面活性剤との強い相互作用によって膜タンパク質の構造変化を誘導することが知られている。従って、界面活性剤共存下で解析された膜タンパク質の構造やはたらきが本来の細胞膜に存在する場合と同一であるかについては大いに議論の余地があった。界面活性剤ミセル以外に、脂質二分子膜構造を保持した微小な分子集合体としてバイセルや、MSP と呼ばれる膜構造タンパク質を用いた脂質ナノディスクも膜タンパク質の解析に用いられてきたが、分子集合体の不安定性や、ディスクサイズにおける制約といった技術課題があった。したがって、膜タンパク質が本来存在する脂質二分子膜構造を保持しつつも、安定に水中で分散できる膜タンパク質再構成のための新たなマトリックス材料を開発することで、膜タンパク質研究におけるブレークスルーになると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質の新たな解析プラットフォームとして、自在にサイズ制御できる安定な脂質二分子膜ナノディスクを構築することをめざした。前項で述べたように様々な生命機能の発現において膜タンパク質は重要な役割を担っているが、水に対する不溶性から取り扱いは困難であり、天然の構造および活性を維持したまま可溶化できる手法の開発が急務である。ここでは、新たにデザインした両親媒性分子を用いて強固な縁取り構造を形成することで脂質ナノディスクの安定化を図り、膜タンパク質の新たな解析プラットフォームを提供することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 脂質ナノディスク形成を誘導する両親媒性分子の合成

脂質二分子膜と相互作用することでナノディスク構造を自発的に形成する分子として、(i)自発的な分子間架橋により有機-無機ハイブリッド構造を形成する短鎖脂質分子(図1)および(ii)  $\alpha$ -helix構造を形成することで両親媒性となるペプチドの2種類をデザインした。前者は、ジヘキシルアミンを出発原料として4段階で合成を行った。後者に関しては、Fmoc 固相合成法により目的とするペプチドを得たのち、逆相 HPLC によって得られたペプチドの精製を行った。

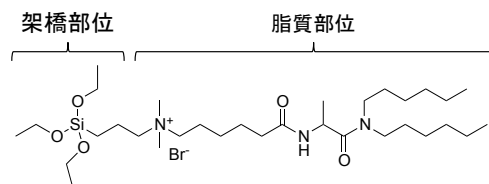


図1. ナノディスク形成短鎖脂質の分子構造

(2) 脂質ナノディスクの形成評価および膜タンパク質の組み込み

リン脂質で形成されたリポソームを用いて、前項で合成を行った両親媒性分子による自発的なナノディスクの形成について評価を行った。はじめに、水中で形成される分子集合体のサイズについて動的光散乱(DLS)法によって評価した後に、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて分子集合体の形態に関して可視化を行った。膜タンパク質の組み込みについては、バクテリオロドプシンを対象とし、紫外-可視吸収スペクトルから評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) 有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質ナノディスクの形成

本項での脂質ナノディスクの形成原理として、これまでにリン脂質系で報告されているバイセルを参考にした。バイセルとは、面部分を構成する長鎖脂質と縁取り部を形成する短鎖脂質との混合によって自発的に得られるディスク状脂質二分子膜である。本研究においては、短鎖脂質として図1で示した分子を用いる事で、分子間架橋されたセラミック相を縁取り部へ導入し、ナノディスクの安定化をはかった。この脂質分子は、頭部にトリエトキシシリル基を有しており、水中での自発的な加水分解と重縮合反応(ゾル-ゲル反応)によって分子間架橋されたセラミック相を形成することが可能である。

合成した脂質分子とリン脂質(1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DMPC)を2:7のモル比で混合したサンプルのDLS測定より、直径約13 nmの分子集合体の形成が示された(図2a)。また、同一サンプルのCryo-TEM観察を行ったところ、ディスク状の分子集合体の形成が確認された(図2b)。電子線照射方向に対して縦に配

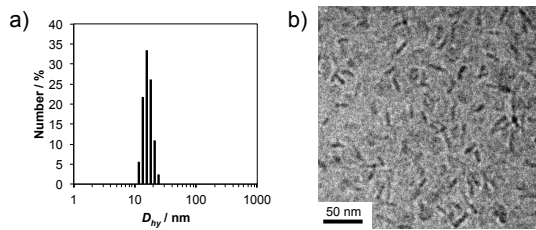


図 2. 有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質ナノディスクの (a)DLS 測定結果および (b)Cryo-TEM 像

向したナノディスクを対象に厚さを見積もったところ、約 5 nm であったことから、それぞれのナノディスクは単一の脂質二分子膜から構成されていることがわかった。したがって、今回設計を行った短鎖脂質を用いても、リン脂質混合系と同様にナノディスク構造の形成が可能であることを明らかにした。また、短鎖脂質と長鎖脂質の組成比を変えることによってナノディスクの直径が制御出来ることもわかった。

### (2) 両親媒性ペプチドによる脂質ナノディスクの形成

つづいて、脂質二分子膜と相互作用することで、自発的に膜構造を断片化し、ナノディスクを形成する両親媒性ペプチドの分子設計に関して検討を行った。ここで求められるペプチドの重要な設計因子は、(i) 膜と相互作用するために両親媒構造を形成すること、(ii) ペプチドが膜界面においてバンドル(束)構造を形成し、ナノディスクの縁取りを安定化することの 2 点である。ここでは、複数の  $\alpha$ -helix が集合しバンドル構造を形成することが知られているバクテリオファージ  $\phi$ X174 の H-protein をテンプレートとし、バンドル内側のアミノ酸残基を疎水性のアミノ酸残基として置き換えた 22 アミノ酸残基からなるペプチド(図 3a)をデザインし、そのナノディスク形成能に関して評価した。

DMPC リポソームに対して 10 mole% のペプチドを添加した場合には、流体力学的直径が約 16 nm の粒子が形成されていることが DLS 測定より明らかになった。また、ネガティブ染色法による TEM 観察からは、等間隔で厚さ約 5nm の粒子が積層した像が得られたことか

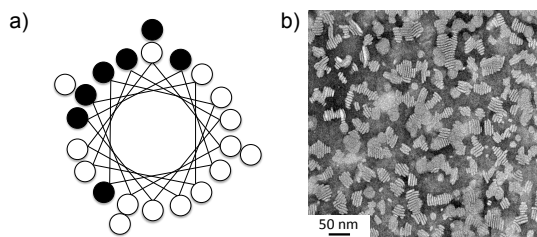


図 3. (a)設計した両親媒性ペプチドの模式図(白:親水性アミノ酸残基, 黒:疎水性アミノ酸残基)および (b)ペプチドによって形成されたナノディスクのネガティブ染色 TEM 像

ら、ナノディスク構造の形成が示唆された(図 3b)。これらの結果より、膜活性ペプチドは、脂質二分子膜を直接断片化し、ナノディスクを形成できることが明らかになった。また、得られたナノディスクの  $^{31}\text{P}$  NMR 測定から、ナノディスクは磁場に対して配向せず、十分に速く回転することで等方的に振る舞っていることが明らかになった。このことは、溶液 NMR を用いた膜タンパク質の解析において、従来の界面活性剤ミセルの代替として本脂質ナノディスクを再構成マトリックスとして用いる事ができる可能性を示唆するものである。

### (3) 脂質ナノディスクへの膜タンパク質組み込みとその評価

つづいて、得られたナノディスクに対する膜タンパク質の組み込みに関して評価を行った。ここでは、これまでにリン脂質リポソーム系で再構成手法が確立しているバクテリオロドプシン(bR)を対象として、(1)の項目で検討した有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質ナノディスクに対する組み込みを検討した。bR を短鎖脂質分子によって可溶化し、DMPC リポソームと混合することでサンプルの調製を行った。DLS 測定および cryo-TEM 観察より、bR の組み込みによって有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質ナノディスクはその構造を維持できることが明らかになった(図 4a)。また、得られた bR 含有ナノディスクの紫外-可視吸収スペクトル測定を行ったところ、全脂質濃度の増加に伴ってレチナル由来の 540 nm における吸収極大が現れた事から(図 4b)、ハイブリッド脂質ナノディスクへ bR が構造を保って再構成できることを明らかにした。

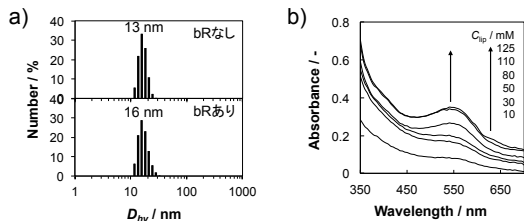


図 4. (a)bR 含有および非含有ナノディスクの DLS 測定結果 (b)ナノディスクに組み込まれた bR の紫外可視吸収スペクトル

### (4) まとめと今後の展望

本研究を通じて、有機-無機ハイブリッド構造を導入した脂質ナノディスクおよび、両親媒性ペプチドを用いた脂質ナノディスクの開発を行った。本研究で開発した脂質ナノディスクは、いずれも脂質二分子膜構造を維持しており、細胞膜環境を忠実に再現した膜タンパク質の新しい解析プラットフォームとして利用が可能であると考えられる。今後は、従来の再構成系において評価が困難であった膜タンパク質(G タンパク質結合受容体

等)の解析への適用および膜タンパク質-脂質膜複合体を構成単位とした新たな材料創成が期待される。

#### 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6件)

- ① K. Yasuhara, (他6名, 7番目), Lipid-membrane-incorporated hydrophobic photochromic molecules prepared by the exchange method using cyclodextrins, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **13**, 6175-6182, (2015), doi: 10.1039/C5OB00240K.
- ② K. Yasuhara, (他1名, 1番目), Kinetic study of all-or-none hemolysis induced by cationic amphiphilic polymethacrylates with antimicrobial activity, *Chinese Chemical Letters*, **26**(4), 479-484, (2015), doi:10.1016/j.cclet.2015.01.029. 査読有
- ③ K. Yasuhara, (他3名, 4番目), Modulation of raft domains in a lipid bilayer by boundary-active curcumin, *Chemical Communications*, **50**, 3427-3430, (2014), doi:10.1039/C3CC47738J. 査読有
- ④ K. Yasuhara, (他4名, 2番目), Morphological Change of Cell Membrane by Interaction with Domain-Swapped Cytochrome c Oligomers, *ChemBioChem*, **15**, 517-521, (2014), doi:10.1002/cbic.201300728. 査読有
- ⑤ K. Yasuhara, (他5名, 6番目) Dynamic behaviour in giant unilamellar vesicles induced by the uptake of [70]fullerene, *Chemical Communications*, **50**, 1288-1291, (2014), doi:10.1039/C3CC47711H. 査読有
- ⑥ K. Yasuhara, (他6名, 4番目) [70]Fullerenes Assists the Formation of Phospholipid Bicelles at Low Lipid Concentrations, *Langmuir*, **30**(41), 12315-12320, (2014), doi:10.1021/la503732q. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 安原主馬, 両親媒性高分子を用いた細胞膜曲率センサーの開発, 日本化学会第95春季年会, 2015.3.28, 日本大学理工学部(千葉県船橋市)
- ② K. Yasuhara, Designed amphiphilic peptides toward fabrication of lipid-peptide nanoparticles, 248th ACS National Meeting, 2014.8.13, San Francisco, CA (USA)
- ③ K. Yasuhara, Design of Peptides that Assemble Lipid Nanodiscs, The 28th Annual Symposium of The Protein Society, 2014.7.28, San Diego, CA (USA)

- ④ 安原主馬, 細胞膜を攻撃する抗菌剤の分子デザインと作用機構, 第62回高分子討論会, 2013.9.11, 金沢大学(石川県金沢市)
- ⑤ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッド脂質の自己組織化とバイオ応用, 奈良先端未来開拓コロキウム, 2013.8.9, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)
- ⑥ K. Yasuhara, Antimicrobial action of metal-chelating artificial oligopeptides, ISMSC-8, 2014.7.8, Arlington, VA (USA).

[その他]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安原 主馬 (YASUHARA KAZUMA)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号: 90545716