

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660073

研究課題名(和文)新規糖脂質MPlaseを利用した機能的膜タンパク質の可溶化剤の開発

研究課題名(英文)Development of solubilizer dedicated for membrane proteins using glycolipozyme MPlase

研究代表者

西山 賢一(Nishiyama, Ken-ichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80291334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MPlaseはタンパク質膜挿入に必須の糖脂質である。MPlaseは糖鎖部分と脂質部分がピロリン酸を介して連結されている。ピロリン酸の中央で切断した糖鎖部分(PP-MPlase)は、膜タンパク質と可溶性の複合体を形成するため、この糖鎖は膜タンパク質可溶化剤として有用である。MPlase誘導体を検討したところ、酢酸処理した糖鎖(AcOH-MPlase)はPP-MPlaseからリン酸が除去された構造をもつ。AcOH-MPlaseは膜タンパク質と相互作用しなくなった。これらの結果から、MPlaseの糖鎖と膜タンパク質との相互作用には、多くのアセチル基だけでなくリン酸基も必須であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：MPlase is a glycolipid involved in protein integration into membranes. MPlase consists of a glycan chain and a lipid moiety, connected through a pyrophosphate linker. The glycan chain, obtained by cleaving MPlase at the center of pyrophosphate, forms a soluble complex with a membrane protein, which is integration-competent. This property of PP-MPlase is suitable for the solubilizer for membrane proteins. A search of modification of the glycan chain revealed that the glycan chain obtained by acetic acid digestion (AcOH-MPlase), in which a phosphate residue has been removed, has lost the ability to interact with membrane protein, strongly suggesting that not only many acetyl residues but also a phosphate residue are essential for interaction between the glycan chain of MPlase and membrane proteins.

研究分野：生化学

キーワード：膜タンパク質 糖脂質酵素 MPlase 可溶化剤

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質はすべての細胞で発現し、物質輸送、情報伝達など、生命現象に必須の役割を果たしている。近年では、新規薬剤開発のためのターゲットとして特に注目されている。一方、膜タンパク質はその疎水的な性質のため、精製や機能解析などの取り扱いが容易ではない。試験管内タンパク質合成系で膜タンパク質を合成する試みが多くなされているが、界面活性剤の種類や濃度をケースバイケースで検討する必要があるなど、普遍的な方法とは言い難い状況である。そのため、汎用的な膜タンパク質の可溶化剤の開発が望まれていた。さらに、界面活性剤は膜小胞やリポソームも可溶化してしまうため、膜タンパク質の機能解析には、界面活性剤を除去し、プロテオリポソームに再構成するという過程を膜タンパク質ごとに条件設定する必要があった。

申請者は、タンパク質膜挿入機構を明らかにするため、膜挿入反応の再構成系を確立し、この再構成系により、調べたすべての膜タンパク質の膜挿入に必須である膜挿入因子を同定した。この因子は、当初の予想に反して糖脂質であったが、膜挿入反応に必須であることから MPIase (Membrane Protein Integrase) と命名し、続いてその構造を決定した (図 1)。MPIase の糖鎖は、N-アセチル化された 3 種のアミノ糖を単位とした繰り返し 9~11 回連続し、これがピロリン酸を介してジアシルグリセロール (DAG) に連結していた。MPIase をピロリン酸フォスファターゼ消化すると脂質部分を欠いた水溶性の糖鎖部分 (PP-MPIase) が得られる。PP-MPIase は一部の膜挿入反応において機能的であり、膜タンパク質と水溶性の複合体を形成した。

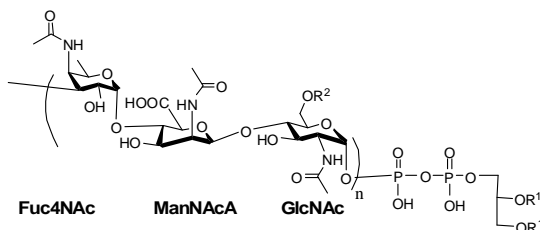


図 1 MPIase の構造。n は 9 ~ 11 の整数、R¹ は炭素鎖 16 および 18 の飽和 / 不飽和脂肪酸残基、R² は水素原子またはアセチル基である。また、GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、ManNAcA は N-アセチルマンノサミンウロン酸、Fuc4NAc は 4-N-アセチルアミノフコースを示す。

2. 研究の目的

本研究では、PP-MPIase を改変して機能的膜タンパク質の可溶化剤として利用することを目的とした。PP-MPIase は膜タンパク質と水溶性の複合体を形成するが、約 1 時間で膜挿入活性がほぼ半分になる。したがって、

MPIase を化学的、遺伝学的に改変し、膜タンパク質と安定な複合体を形成できる誘導体、変異体を構築する。これらの誘導体、変異体から水溶性の PP-MPIase を調製し、膜タンパク質の可溶化剤として使用できるかどうか、試験管内合成系を用いて検証する。

MPIase は、申請者が世界に先駆けて膜タンパク質膜挿入の再構成系を構築したことにより同定が可能となった。さらに、MPIase は糖脂質酵素 (Glycolipozyme) であるという、全く新しい概念を提唱している。本研究により膜タンパク質一般に利用できる可溶化剤の開発に成功すれば、試験管内タンパク質合成系と組み合わせて、機能未知の膜タンパク質の機能解析のための画期的なプラットフォーム技術となることが期待される。

3. 研究の方法

まず、PP-MPIase が膜タンパク質と可溶性の複合体を形成し、膜挿入反応を保持しているという実験結果を足掛かりとして、MPIase 誘導体を調製する。調製した MPIase 変異体・誘導体が膜タンパク質と複合体を形成するかどうかについては、ゲルろ過分析で調べる (図 2)。膜挿入活性を保持しているかどうかについては、DAG を含み自発的膜挿入が抑制されたりポソームを使って、プロテアーゼ・プロテクション・アッセイにより調べる。膜に挿入した部分は外部から加えたプロテアーゼ消化から保護されることを指標として調べることができる (図 3)。

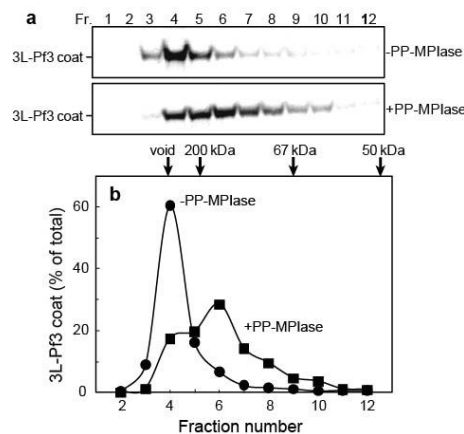


図 2 ゲルろ過による PP-MPIase と膜タンパク質との複合体解析。PP-MPIase 存在下、非存在下で膜タンパク質を合成し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。各画分の回収される膜タンパク質を検出し (a)、定量後プロットした (b)。

MPIase の脂質部分を欠く水溶性の PP-MPIase が実際に様々な膜タンパク質と水溶性の複合体を形成できるかどうか調べ、膜タンパク質可溶化剤として利用可能な MPIase 変異体・誘導体作成の準備を行う。MPIase の GlcNAc 残基の一部がアセチル化されていて、このアセチル基は膜挿入活性や膜タンパク質との相互作用に必須である。その

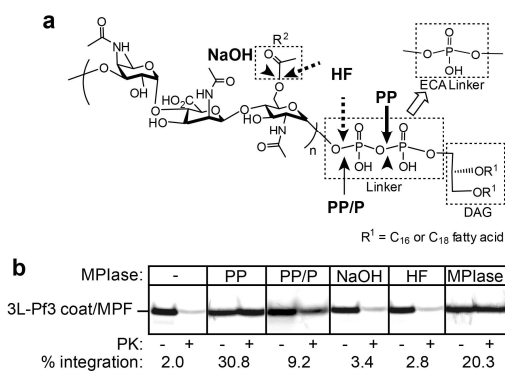


図3 MPIaseの構造機能損傷関係。(a) MPIase誘導体の構造。(b) MPIase誘導体の活性。

ため、GlcNAc 残基に酵素的・化学的にアセチル基を導入し、複合体が安定化されるかどうか調べる。

得られた MPIase 変異体・誘導体が膜タンパク質と安定な複合体を形成できるかどうか調べる。十分に安定な複合体形成が認められた場合、様々な膜タンパク質で同様の効果があるかどうか検証し、汎用的な膜タンパク質可溶化剤としての商品化を検討する。

4. 研究成果

(1) AcOH-MPIase の調製と膜タンパク質との相互作用解析

PP-MPIase は、MPIase を界面活性剤で可溶化した後ピロリン酸フォスファターゼ消化によって生成する。しかし、酵素消化には実験によって消化され方が不均質であること、反応後界面活性剤を完全に除去する必要があることから、大量に調製することが困難であった。そこで、まず MPIase を穏やかな条件で酢酸処理してアセチル基を保持した MPIase の糖鎖部分 (AcOH-MPIase) を調製した。NMR 分析により、AcOH-MPIase は未処理の MPIase と同様の糖鎖構造を保持していること、しかし、リン酸部分は完全に消失していることが明らかとなった。したがって、AcOH-MPIase は、PP/P-MPIase (図3) と基本的に同じ構造を取っていることが明らかになった。AcOH-MPIase とモデル膜タンパク質 3L-Pf3 coat (図2、3) との相互作用をゲルろ過分析で調べた。しかし、PP-MPIase とは異なり、AcOH-MPIase と 3L-Pf3 coat との相互作用は全く観察できなかった。一方、AcOH-MPIase は PP-MPIase と同様に 8 量体と考えられるオリゴマー構造は形成していることが判明した。AcOH-MPIase が 3L-Pf3 coat の膜挿入反応を触媒するかどうか調べたところ、膜挿入活性は全く検出できなかった。AcOH-MPIase と水溶液にけん濁した MPIase を混合して膜挿入活性を測定してみたが、膜挿入活性は検出できなかった。したがって、AcOH-MPIase は膜タンパク質を可溶化し、膜挿入させる機能が欠損していることが明らか

かになった。PP/P-MPIase に若干の活性が検出されたのは、アルカリフォスファターゼの作用が不十分で、PP/P-MPIase 標品中に PP-MPIase が一部混入していたためであると考えられる。これらの結果は、MPIase の (ピロ) リン酸基は膜タンパク質との相互作用、膜挿入活性のどちらにも必須であることが明らかとなった。MPIase を温和な条件で水酸化ナトリウム処理した MPIase (NaOH-MPIase) は、PP-MPIase 同様にリン酸基を保持しているが、PP-MPIase とは異なり糖鎖部分のアセチル基 (OAc 基) を消失している (図3)。NaOH-MPIase は 3L-Pf3 coat を可溶化する能力はなく、また膜挿入活性も消失していた。これらのことから、MPIase と膜タンパク質との相互作用には、糖鎖部分のアセチル基とアノマー位のリン酸基の両方が必須であることが判明した。

(2) MPIase 変異体・誘導体の調製

別研究プロジェクトにより MPIase 生合成の第一段階の酵素を同定した。この酵素を枯渇させると菌が致死的になることが明らかになっている。この変異株を用いて、現在、MPIase 変異体が発現しているかどうか調べている。

化学的にも MPIase 誘導体を調製している。MPIase のアセチル基 (OAc 基) は GlcNAc 残基の約 1/3 にしか修飾されていない。残りの GlcNAc の OH 基をアセチル化したもの、ベンジル化したものを調製した。AcOH-MPIase に膜タンパク質との相互作用能、膜挿入能が喪失しており、PP-MPIase を出発材料としたため、調製が遅れていたが、今後膜タンパク質との相互作用が安定化されているかどうか検証する。

(3) 基質レベルでの相互作用解析

上記 (1) の解析は、基質膜タンパク質として放射能標識を行ったものを使用している。この場合、検出感度は極めて高いが、絶対量は使用 PP-MPIase の 1/1000 から 1/10000 と、PP-MPIase に比べて非常に少ない条件である。相互作用を定量的に評価するためには解離定数を求めることが必要となるため、3L-Pf3 coat タンパク質を精製した。精製は高濃度 (6 M) 尿素存在下で行った。逆相カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した。この非放射性 3L-Pf3 coat を用いて膜挿入活性を調べたところ、効率のよい膜挿入活性が検出された。さらに、PP-MPIase との相互作用も観察された。この系を用いて、現在解離定数を測定している。

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6件)

Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y. Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T. and Nureki, O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC *Nature*, **509**, 516-520 (2014) 査読有 doi:10.1038/nature13167

Nishiyama, K. and Shimamoto, K. Glycolipozyme membrane protein integrase (MPlase): recent data *BioMol Concepts*, **5**, 429-438 (2014) 査読有 doi: 10.1515/bmc-2014-0030

島本啓子、西山賢一
タンパク質膜挿入の鍵を握るグライコリポザイム～タンパク質でない酵素?～
実験医学増刊「代謝」, **32**, 115-122 (2014) 査読有

西山賢一、島本啓子
膜タンパク質の鍵は糖脂質にあり - すべての生体膜挿入に必要な因子を求めて
月刊化学, **68**, 30-34 (2013) 査読有

Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H. and Nishiyama, K. Glycolipozyme MPlase is essential for topology inversion of SecE during preprotein translocation *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 9734-9739 (2013) 査読有 doi/10.1073/pnas.1303160110

[学会発表](計17件)

西山賢一、前田 将秀、Moser Michael、楠本 正一、徳田 元、島本 啓子
タンパク質膜挿入・膜透過に関する糖脂質酵素 (Glycolipozyme) MPlase の構造と機能
日本農芸化学会 2015 年度大会 大会シンポジウム「天然物ケミカルバイオロジー研究の新展開」2015.3.29、岡山大学 (岡山県岡山市)

Nishiyama, K.
Reconstitution of preprotein translocation across and membrane protein integration into the cytoplasmic membrane of *E. coli*
「細胞を創る」研究会 7.0, 2014.11.13、東京大学 (東京都文京区)

西山賢一

タンパク質膜挿入に関する糖脂質酵素 MPlase と YidC との機能的相互作用
第9回 無細胞生命科学研究会、2014.10.9.
大阪大学 (大阪府吹田市)

西山賢一
タンパク質膜挿入・膜透過に関する糖脂質酵素 (Glycolipozyme) MPlase の構造と機能
文部科学省特別経費「分子構築イノベーション」フロンティア化学教育研究センター (FCC) 講演会、2014.9.24.北海道大学 (北海道札幌市)

Nishiyama, K.
Functional interaction between glycolipozyme MPlase and the YidC protein in protein integration into membranes
The Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces, 23-26 Jun, 2014 Mount Snow (West Dover, VT, USA)

Michael Moser、Maria Huber、西山賢一
タンパク質膜透過・膜挿入に関わる糖脂質酵素 MPlase と YidC との機能的相互作用
第11回 21世紀大腸菌研究会、2014.6.5-6.
ホテル大観 (岩手県盛岡市)

西山賢一
タンパク質膜透過・膜挿入に関する糖脂質酵素 (glycolipozyme) MPlase の構造と機能
第258回生物科学セミナー、2014.4.24.
大阪大学 (大阪府吹田市)

Michael Moser、永森 收志、Maria Huber、徳田 元、西山賢一
タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPlase がタンパク質膜透過反応に及ぼす役割
第8回無細胞生命科学研究会 2013.10.21.
新潟大学 (新潟)

Michael Moser、永森 收志、Maria Huber、徳田 元、西山賢一
糖脂質酵素 MPlase はタンパク質膜透過反応において SecE の配向性反転に必須である
第86回日本生化学会大会、2013.9.23.
パシフィコ横浜 (横浜)

西山賢一
糖脂質酵素 MPlase はタンパク質膜透過反応において SecE の配向性反転に必須である
第10回21世紀大腸菌研究会、2013.6.20.
ラフォーレ修善寺 (静岡)

〔その他〕

ホームページ等

西山研ホームページ

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~sec/>

(

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 賢一 (NISHIYAMA, Ken-ichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80291334

(2) 連携研究者

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

徳田 元 (TOKUDA, Hajime)

盛岡大学・栄養科学部・教授

研究者番号：40125943