

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891016

研究課題名(和文) 膜タンパク質構造におけるフレキシビリティのNMR解析

研究課題名(英文) NMR analysis of the structural flexibility of membrane proteins

研究代表者

小澤 潔 (Ozawa, Kiyoshi)

大阪大学・たんぱく質研究所・研究員

研究者番号：20251770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高度好塩古細菌由来の光走性シグナル伝達膜蛋白質、pHtrII (1-159) 蛋白質の全長構造は、その不安定さのため明らかになっていない。また細胞膜中で多重体として存在し機能すると考えられおり、その実体は不明な点が多い。そこで私は、自作の改変型大腸菌の無細胞蛋白質合成系を用いることで、pHtrII を安価に高効率で生産、重水素化し、ナノディスク上で溶液 NMR によるシグナルを観測することに始めて成功した。この結果、pH6.5 と pH7.0 および、界面活性剤存在下での溶液構造とナノディスク膜上での非界面活性剤存在下でのそれでは、pHtrII の立体構造が大きく違うことが判明した。

研究成果の概要(英文)：pHtrII(1-159) protein is a bacterial phototaxis transducer membrane protein from *Natronomonas pharaonis* and functions as a cognate transducer to the pharaonis phoborhodopsin. The full length of this transducer has yet to be obtained owing mainly to the difficulties in obtaining this complex in a stable form that eases its structural and functional studies.

In this study, I attempted the use of the phospholipid bilayer nanodisc for studying the structure of pHtrII(1-159) in solution NMR. Cell-free expressed ¹⁵N, ²H-labelled pHtrII (1-159) transducer was purified, and it was successfully reconstituted into a nanodisc. Consequently the NMR analysis of the pHtrII (1-159) transducer in a nanodisc provides important information on structural changes between pH6.5 and pH7.0, and between with and without nanodiscs.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：NMR ナノディスク 無細胞蛋白質合成系 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

G-蛋白質共役受容体 (GPCR)、光走性シグナル伝達蛋白質 (pHtrII) 等の重要膜蛋白質の大腸菌、もしくは昆虫細胞での大量発現系を構築し、その安定同位体標識試料を調製した後、ナノディスク膜 (不溶性蛋白質を膜骨格蛋白質 (MSP1) のベルトによって囲み、天然に近いリン脂質二重膜構造をとるナノ構造体) 上に再構成し、溶液核磁気共鳴装置 (NMR) による直接シグナル観測を試みる。

2. 研究の目的

大量発現系の構築、安定化が難しい膜蛋白質のナノディスク膜上での溶液 NMR による構造解析を可能にするために、重水素による安価で効率的な安定同位体標識法を確立する。それにより、特に X-線結晶解析の苦手とするフレキシブルなループ領域のアミノ酸の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト GPCR (タチキニン NK1 受容体)、高度好塩性古細菌由来 pHtrII の大腸菌、もしくは昆虫細胞での発現系を構築し、その安定同位体標識試料を調製した後、ナノディスク膜上に再構成し、溶液 NMR による直接観測を試みる。1) ヒトタチキニン NK1 受容体の昆虫細胞での EGFP (強化緑色蛍光タンパク質) との融合蛋白質としての発現系を作成し、その蛍光を指標として、大量発現系確立のための条件検討および精製を行う。と同時に、安価な安定同位体標識を可能にするための自作の無細胞蛋白質発現系 (大腸菌および昆虫細胞抽出液) の利用も積極的に試みる。2) ファーマンターを用いた大腸菌による、ナノディスク構成蛋白質 MSP1 の大量発現系を構築し、NMR 測定に供することが可能な収量を得る。また、二回膜貫通蛋白質 (pHtrII) の安定同位体標識とナノディスク膜上での再構成実験を行い、さらにその複合体の溶液 二次元-NMR 測定を行う。

4. 研究成果

1) タチキニン NK1 受容体の昆虫細胞での EGFP との融合蛋白質としての発現系の作成に成功し、大量発現のための条件および効率的精製方法の検討を行っている段階である [図 1]。また、安価な安定同位体標識のための自作の無細胞蛋白質発現系の利用も積極的に試みている。

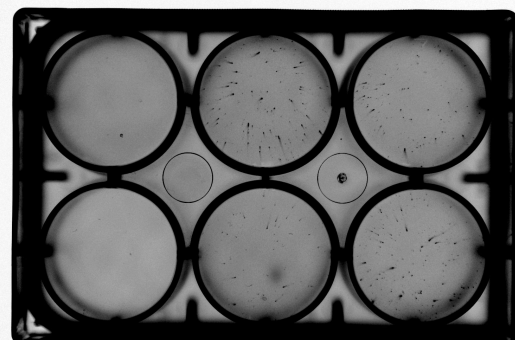


図 1: 昆虫細胞 Sf9 内で発現している EGFP-タチキニン NK1 受容体の蛍光観測

(6-well プレート上の黒いドットそれぞれが、発現した細胞)

2) ファーマンターを用いた大腸菌による、ナノディスク構成蛋白質 MSP1 の大量発現系を構築し、NMR 測定に供することが可能な収量を得ることができた。また、二回膜貫通蛋白質 (pHtrII) の安定同位体標

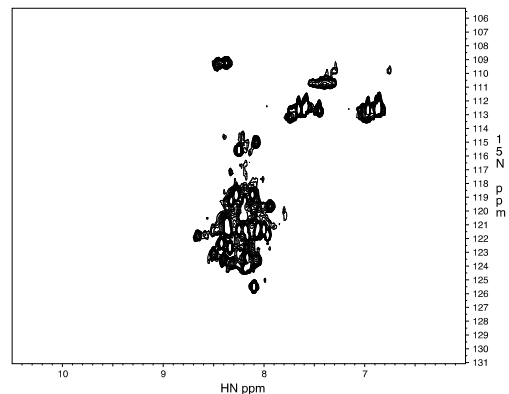


図 2: 界面活性剤 0.1%DDM 中に可溶化され精製された ^{15}N -pHtrII の二次元 ^1H , ^{15}N -NMR スペクトル (pH6.5)

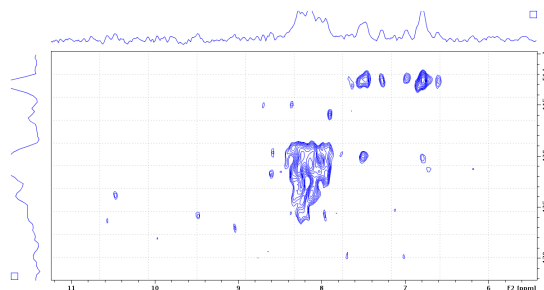


図 3: ナノディスク上に再構成され可溶化された ^{15}N -pHtrII の二次元 ^1H , ^{15}N -NMR スペクトル (pH7.0)

識とナノディスク膜上での再構成実験に成功し、さらにその複合体の溶液 二次元 ^1H , ^{15}N -NMR 測定を行った [図 2, 3]。

その結果、高分子量膜蛋白質・多重体、あるいは複合体の人工細胞膜 (ナノディスク膜) 中での NMR シグナルの観測のためには、膜蛋白質の重水素化が必須であることの再確認ができた。そこで次に、重水素標識膜蛋白質を高効率で安価に生産できる大腸菌の無細胞蛋白質合成システムに切り替え、これを重水素標識用に独自に改良し、pHtrII に適用した結果、驚いたことに、その可溶性画分に、界面活性剤無しで 1.5 mg/ml 以上の高効率の、 ^2H , ^{15}N -pHtrII が生産されることが判明した。これを溶液 NMR により測定したものが、図 4 (青シグナル) に示されている。

また、図 4 (赤シグナル) には、それをナノディスク上に再構成したものも、重ねあわせた。結果、図 2、および図 3 とそれぞれ比較すれば明らかなように、重水素化さ

れた pHtrII の NMR シグナルの分解能と感度はともに飛躍的に向上し、さらに、pHtrII 単独なものと、そのナノディスク上

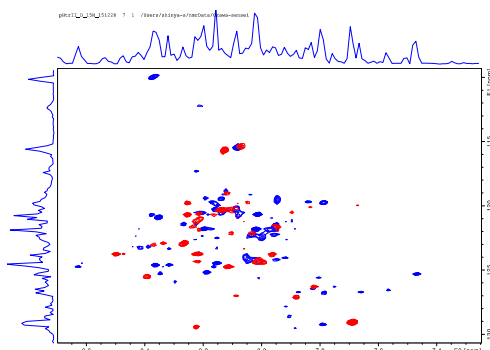


図4：重水素化 ^2H , ^{15}N -pHtrII の二次元 ^1H , ^{15}N -NMR スペクトル (青シグナルは単独そして赤シグナルは、ナノディスク上)

に再構成されたものでは、NMR シグナルの分布に大きく変化が見られた。また、界面活性の有無での pHtrII 単独での大きなシグナル変化はほとんど見られなかったが、pH7.0 と pH6.5 では、そのシグナル数が大きく変わることも判明した。これは、ゲルろ過による分析によると、pHtrII は、pH7.0 ではほぼすべて、可溶性の凝集体となっており、ポイドボリュームに溶出するが、pH6.5 では、少なくとも1ヶ月程度は4から室温で安定に分散していることがわかった。また、ナノディスク上に再構成した pHtrII は、pH7.0 でも凝集体とはなっておらず、単独の状態とは異なる分散状態で機能していると図4からも確認できたことで、さらなるシグナルの帰属作業への道筋が確立できた、と考えている。試料の作り方は、 ^2H , ^{15}N -pHtrII と三次元 NMR 測定用の ^2H , ^{15}N , ^{13}C -pHtrII とは全く同一方法が使用できるからである。また、この ^2H , ^{15}N , ^{13}C -pHtrII 試料を作成すれば、これを固体 NMR による測定にも適用できるため、解析法を多様化できるメリットもある。また、この無細胞蛋白質合成系の改良型安定同位体標識方法を用いれば、遺伝子クローニング無しのポリマーゼチェーン・リアクション (PCR) 法により、容易かつ同時に多数の変異体を作成出来るので、シグナルの帰属を溶液の二次元 NMR だけで (例えばアラニンスキャンニング法などを用いても、) 比較的楽に完成することも可能であるため、帰属のスピードアップ化にも大変貢献できると考えている。さらに、常時性タグなどを (pHtrII に部位特異的に導入する方法とともに) 用いれば、常時性 NMR 法、あるいは、常時性電子スピン共鳴法を用いて、詳細な距離情報、構造情報なども、(長時間の測定が必要な三次元 NMR 測定を行わずとも) 圧倒的に迅速に得られると期待される。したがって、目的としていた (機能発現に重要な役割を担う

と考られている) 膜蛋白質構造におけるフレキシブルなループ領域のアミノ酸の役割もその NMR シグナルの帰属が完成すれば、自ずと明らかにできると思われる。本研究では、その土台作り (後はやるだけ状態) に成功した、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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Ozawa, K. Combio2014 (キャンベラ、オーストラリア) NMR analysis of the transmembrane bacterial transducer protein pHtrII reconstituted into a nanodisc

小澤 潔 無細胞蛋白質合成系による非天然アミノ酸の導入法 第9回 無細胞生命科学研究会 (阪大吹田キャンパス)

Ozawa, K. Cell-free protein synthesis for NMR structural analysis of large proteins and complexes. Plant and Food Research Meeting (オークランド、ニュージーランド)

〔図書〕(計 1 件)

Kralicek, A. V. and Ozawa, K. Cell-free protein synthesis for NMR structural analysis of large proteins and complexes. In Application of NMR Spectroscopy, (2016) Vol. 4, Applications in Food Sciences. Atta-ur-Rahman and M. Iqbal Chaudhary Eds, Bentham Science Publishers, pp. 263-290.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 潔 (OZAWA Kiyoshi)
(大阪大学・蛋白質研究所・研究員)
研究者番号：20251770

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：