

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893117

研究課題名(和文)新規可溶化剤と溶液NMRを用いた薬剤耐性S31N変異体M2チャンネルの構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of Am-resistant M2-S31N mutant using a novel detergent and solution NMR

研究代表者

河野 健一 (Kawano, Kenichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：70732874

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)：膜タンパク質の立体構造解析に用いる新規可溶化剤とモデル膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)の合成と精製方法を最初に確立した。予備検討として、bRで新規可溶化剤の物性評価を行ったところ、可溶化能・熱安定性・時間耐久性・ミセルサイズなどが既存の可溶化剤よりも格段に優れていることが分かった。次に、大腸菌合成系でM2タンパク質の発現と精製方法の確立に成功したが、分子間でのジスルフィド結合が不十分だった。そこで、架橋形成を促進するために自己会合型コイルドコイル配列を導入した変異体を作製した。今後、二量体形成を確認して溶液NMRで立体構造解析に取り掛かりたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The synthesis and purification methods of a novel detergent were established. Before applying it to M2 protein, the well-studied photosensitive bacteriorhodopsin (bR) was used as a model membrane protein to examine the solubilization ability of the detergent, and the time-dependent thermal stability of bR in the detergent micelle, monitoring change in the absorbance spectrum. As a result, the abilities of the detergent were proven to be significantly improved compared with the existing detergents. The micelle size after solubilizing bR was available for solution NMR. Although the expression of M2 protein was confirmed by the Western blotting, only a part of M2 protein formed the dimers crosslinked by the disulfide bonds at the N-termini. To facilitate the crosslinking, a self-associating coiled-coil sequence was inserted into the N-terminus of the M2 protein. The structural analysis of the dimeric M2 protein will be started following confirmation of M2 dimerization.

研究分野：物理化学

キーワード：可溶化剤 M2プロトンチャンネル S31N変異体 溶液NMR A型インフルエンザウイルス アマンタジン耐性 二量体

1. 研究開始当初の背景

(1) A 型インフルエンザウイルスの M2 タンパク質は、安定な四量体のプロトンチャネルを形成すると考えられており、抗ウイルス薬アマンタジン塩酸塩 (Am) の標的となっている。しかしながら、2003 年以降、世界規模で急増した Am 耐性株 S31N 変異体の全長の立体構造は解かれておらず、薬剤耐性メカニズムは未だに不明なままである。これまで、溶液および固体 NMR を用いて、Am 誘導体と結合した S31N 変異体の四量体構造が報告されている (*PNAS* (2013) 110, 1315; *JACS* (2013) 135, 9885) が、全長 M2 タンパク質ではなく膜貫通領域を含むフラグメントペプチドの構造を解析しているため、その結果が必ずしも生体膜中の構造を反映しているとは限らない。また、分子量の制限により、溶液 NMR に使用できる可溶化剤は界面活性剤に限られている。NMR 法はタンパク質の構造や分子ダイナミクス情報が得られる優れた手法であるが、単独では対称性の高いタンパク質の会合状態を定量的に判別することは難しい。

(2) 我々はこれまでの研究で、生細胞膜中に野生型 M2 を発現させて、特異的に蛍光標識した後に 蛍光共鳴エネルギー移動によりその会合状態を定量的に解析した。その結果、野生型 M2 の会合状態は安定な四量体ではなく、pH に応じて可逆的に二量体 (pH 6.0) と四量体 (pH 4.9) の平衡状態を取り得ることを発見した (図 1、*J. Mol. Biol.* (2014) 426, 2679)。また、四量体だけでなく二量体にもチャネル活性があり、Am を投与すると二量体に結合してチャネル活性を阻害したことから、M2 の最小機能単位は二量体であることを我々は提唱している。

(3) 驚く事に、S31N 変異体の会合状態を解析した結果、pH に拘らず常時二量体を形成することが明らかになった。また、Am 存在下において、S31N のチャネル活性は Am の影響を受けなかったことから、S31N 変異体の Am 耐性と符合した。

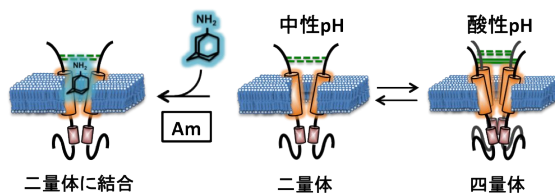


図 1 野生型 M2 の新規会合状態モデル

2. 研究の目的

近年出現した抗 A 型インフルエンザウイルス薬アマンタジン (Am) 耐性 M2-S31N 変異体は、これまで安定な四量体を形成すると考えられてきたが、構造解析は十分に進んでおらず Am 耐性メカニズムについても未だに不明な

ままである。我々はこれまでの研究で、S31N 変異体は生体膜中において定常的に二量体を形成することを発見した。本研究の目的は、当研究室で開発した新規小分子可溶化剤 (CholyI-PC および CholyI-PA) で全長 S31N 変異体タンパク質を可溶化し、生体膜環境を模した条件下で高分解能溶液 NMR を用いて S31N 変異株の構造解析を行うことである。本研究が成功すれば、これまで明らかにされていなかった S31N 変異体の構造解析にブレークスルーをもたらすだけでなく、Am 耐性メカニズムの解明と新たなチャネル阻害薬の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) CholyI-PA の合成および物性評価

初めに新規可溶化剤 CholyI-PC / CholyI-PA の組成を検討し、モデル膜タンパク質としてバクテリオロドプシン (bR) の構造を長時間保持できることを確認した上で、S31N 変異体タンパク質の可溶化実験に進んだ。我々は、これまでに CholyI-PC の合成および酵素ホスホリパーゼ D を用いた CholyI-PC から CholyI-PA への変換法を確立させている。予備検討でジフェニルヘキサトリエン蛍光を利用して臨界ミセル濃度 (CMC) を測定したところ、CholyI-PC と CholyI-PA の CMC はどちらも約 2 μ M であった。また、CholyI-PC 単体の時よりも CholyI-PC / CholyI-PA を 6 / 4 で混合して可溶化した方が、bR の構造が安定することを見出した。

(2) 無細胞合成系を用いた蛍光標識体 S31N タンパク質の合成

蛍光相関分光法 (FCS) 測定で会合状態を算出するために、無細胞合成系で蛍光標識体 S31N タンパク質の合成を行った。S31N 変異体遺伝子を pTD1 ベクターにサブクローニングし、in vitro タンパク質合成用の mRNA を最初に合成した。この時、蛍光性非天然アミノ酸を指定する塩基配列をベクターに組み込み、合成された S31N タンパク質の N 末端が蛍光標識されるようにデザインした。非天然アミノ酸を指定するコドンは、ストップコドン (TAG) であるため通常ではタンパク質合成は停止するが、蛍光性非天然アミノ酸-トランスファーRNA が存在すると合成が継続されるので、最後まで合成したタンパク質には 100% の効率で蛍光標識体アミノ酸が導入されることになる。これは、後述する FCS 測定で、会合状態を正確に算出するのに非常に重要なことである。調製した mRNA を基に、大腸菌抽出液を用いた無細胞合成キットで S31N のポリペプチド鎖を合成する。大腸菌由来無細胞合成系で S31N タンパク質の合成が難航する場合は、小麦胚芽、昆虫、哺乳類などの無細胞合成系も検討する。また、M2 タンパク質の N 末端には 17 および 19 番目に 2 つの Cys 残基があり、分子間で形成する 2 本のジスルフィド結合が、多量体構造を安定化さ

せる役割があると言われている (*Virology* (1991) 183, 32)。そこで、S31N タンパク質間のジスルフィド架橋形成を促進させるために、従来の合成キットに含まれる還元剤 DTT を加えずに、酸化型と還元型グルタチオン存在下での膜タンパク質合成も試みた (*J. Biotechnol.* (2011) 154, 230)。その後、新規可溶化剤を合成混合溶液の中に共存させて、タンパク質の合成量に変化がないかどうかを調べた。タンパク質の合成量を定量する際は、特異性が非常に高い抗 M2 一次抗体 (14C2) (*Virology* (1991) *Virology* 183, 32; *PLoS One* (2010) 5, e9784) および Alexa680-二次抗体を用いてウェスタンブロットで評価した。M2 タンパク質の発現量を定量的に測定する検量線は既に作製済である。

(3) FCS を用いた S31N 変異体の会合状態の算出

FCS 測定では、共焦点顕微鏡のコンフォーカルボリューム (約 $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ の楕円形極小空間) に入出入りする蛍光標識体 S31N タンパク質の平均蛍光強度と分子数から、一分子あたりの輝度を算出した。単量体のスタンダード膜タンパク質として既に確認が取れているグライコフォリン A 変異体 (GpA*) を用いた (*Anal. Chem.* (2013) 85, 3454)。単量体 GpA* に比べて S31N から 2 倍の輝度が見られれば、二量体のチャンネルを形成していると判断できる。また、拡散時間から S31N / Cholyl-PC / Cholyl-PA 複合体の合計サイズを見積もり、溶液 NMR で測定可能な分子量の範囲内 ($\leq 80 \text{ kDa}$) に収まっていることを確認する。

(4) 大腸菌を用いた全長 S31N タンパク質の大量発現

溶液 NMR 測定に用いる S31N 変異体タンパク質の大量発現には、大腸菌を用いた。S31N 変異体遺伝子を pET28 ベクターにサブクローニングし、大腸菌 BL21 株でリコンビナントに合成した。 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を大腸菌の栄養源として S31N 変異体をリコンビナント合成して ^{15}N 標識を今後行う。大腸菌を用いた M2 フラグメントペプチドの大量発現は数多く報告されている (*Nature* (2008) 451, 591; *JACS* (2010) 132, 17695; *PNAS* (2013) 110, 1315) が、全長 M2 タンパク質はほとんどない (*Nature* (2008) 451, 591)。S31N タンパク質の可溶化は、最初に高い CMC を持つ界面活性剤 (オクチルグルコシド、 $\text{CMC} = 25 \text{ mM}$; コール酸、 $\text{CMC} = 15 \text{ mM}$) で行った後、新規可溶化剤 Cholyl-PC / Cholyl-PA ($\text{CMC} = 2 \mu\text{M}$) と混合し、CMC の差を利用して、S31N 変異体 / Cholyl-PC / Cholyl-PA 複合体を形成させて、透析により界面活性剤を取り除く予定である。

(5) 溶液 NMR 測定

高分解能溶液 NMR (650 および 950 MHz) によ

る縦緩和、横緩和時間、DOSY 測定から複合体の大きさを見積もる。HSQC スペクトル測定を行い、S31N 変異体の二次構造解析を行う。構造解析の可能な最適条件が見つければ、 ^{13}C -グルコースおよび D₂O も用いて標識を行い、ピークの帰属と立体構造解析を行う。精度の高い立体構造を決定するためには、解析に最大で約一週間 (約 170 時間) を要する。新規可溶化剤による膜タンパク質構造の保持時間が 170 時間まで達しない場合、溶液 NMR 測定に必要な積算時間はサンプル濃度に反比例して短くなるので、可能な限り高濃度のサンプル調製を行うようにする。同様の実験を野生型 M2 タンパク質でも行う。野生型と変異体の二量体構造を比較し、S31N 変異体が定量的に二量体を形成する原因を究明する。また、Am と S31N 変異体の相互作用を解析し、結合の有無や結合部位の特定を行う事で、S31N 変異体の Am 耐性メカニズムを解明する。

(6) 分子動力学シミュレーション

現在、共同研究で星野忠次准教授 (千葉大学) に、野生型および S31N 変異体 M2 チャンネルの二量体の分子動力学シミュレーションを依頼している。シミュレーションの計算結果と溶液 NMR 測定結果を照らし合わせて、S31N 変異体 M2 チャンネルのプロトン透過経路を総合的な観点から推定する。

4. 研究成果

(1) 新規可溶化剤の合成およびバクテリオロドプシンを用いた物性評価

Cholyl-PC の合成および酵素ホスホリパーゼ D を用いた Cholyl-PC から Cholyl-PA への変換法を確立させてきた。条件検討の結果、収率を 4% から 12% に向上させることに成功した。新規界面活性剤の物性評価を行うため、これまでに幅広く研究されているバクテリオロドプシンの生合成および精製方法の確立を行った。可溶化剤や熱安定性、時間耐久性、ミセルサイズなどを既存の可溶化剤と比較した結果、最も安定的かつ長時間 (40 少なくとも 1 週間以上) にわたって、膜タンパク質の構造を保持できる事を明らかにした。また、膜タンパク質と可溶化剤の合計分子量が平均 69kDa と、溶液 NMR に応用可能な最小サイズで可溶化できる事も分かった。

しかしながら、高度好塩菌を用いたバクテリオロドプシンの生合成および膜タンパク質の精製方法の確立は、予想以上に時間がかかったため、物性評価を終えるのに 1 年の歳月を要した。研究代表者が所属する研究室ではこれまでに、ドライパウダー状で市販されているバクテリオロドプシンで評価を行ってきた経緯があったが、少量の割に高価であり、凍結乾燥によって脱水させているために Native 状態を反映しにくいのではないかと理由から手法の見直しが行われた。実際に、同じ条件で構造安定性を確認してみても

市販のパウダー状のものと自前で生合成して得られたものでは全く異なる結果を示すことが多かったため、再度データを取り直す必要があった。

(2)無細胞合成系を用いた蛍光標識体 M2 タンパク質の合成

初めに、新規可溶化剤のミセル中における M2 タンパク質の会合状態を FCS 測定で確認するために、無細胞合成系で蛍光標識体 M2 タンパク質の合成を行った。ウェスタンブロットにより、無細胞合成キットで M2 タンパク質の合成は可能である事は確認されたが、単量体と二量体のバンドが見られた。これは、分子間のジスルフィド架橋が部分的にしか形成されていない事に起因していると考えられた。そこで、ジスルフィド形成が起きやすいように、酸化型および還元型グルタミンを様々な比率で添加してみたが、架橋効率が改善されなかった。また、還元剤 DTT を含まない合成キットでは二量体形成がやや促進されたが、大幅な改善には至らなかった。加えて、キット間で実験結果の再現性を取ることが難しく合成量も芳しくなかったため、無細胞合成系を断念して大腸菌での合成系に切り替えた。

(3)大腸菌を用いた M2 タンパク質合成の条件検討

大腸菌で様々な条件検討を行ったところ、大量発現および精製方法の確立に成功した。また、プロテアーゼ処理でタグを切り離す最適な条件を明らかにした。しかしながら、依然として二量体形成が完全でないことと、Ni カラムを用いた精製法では不純物を完璧に取り除くことが出来なかったことから、二量体形成の促進および目的タンパク質の純度向上が課題として残った。そこで、この問題点を解決するために、二量体形成を促進するための自己会合型コイルドコイル (ERE4) を M2 タンパク質に導入した。非常に親和性が高く、 K_D 値はサブナノマイクロオーダーと予測される。純度を向上させるために、His6 タグと Strep タグの両方を用いて様々なバリエーションの M2 プラスミドを作製した(例: His6-Strep-ERE4-Xa-M2 など)。これらのコンストラクトは M2 タンパク質の二量体形成に非常に有望であるだけでなく、2つの異なるタグで精製するため、不純物を取り除きやすいことが期待される。二量体形成を確認でき次第、溶液 NMR 測定に移行する予定である。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 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

河野 健一 (KAWANO, Kenichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
研究員

研究者番号：70732874

(2)研究分担者

(3)連携研究者