

博士論文

ナノディスクを用いた
ABC トランスポーターMsbA の
生化学的及び物理化学的解析

河合武揚

目次

第一章 序論	5-9
1-1. 膜蛋白質研究における課題	5
1-2. 擬似生体膜を用いた膜蛋白質の評価	6-7
1-3. ナノディスクを用いた膜蛋白質の研究	8
1-4. 本研究の目的	8
1-5. MSP1	8
1-6. MsbA	8-9
1-7. 本論文の構成	9
第二章 MsbA のナノディスクによる精製	10-28
[略称]	11
[概要]	
2-1. MsbA-ナノディスクの精製	12
[方法]	
2-2. MSP のベクターの構築	13-15
2-3. MSP の発現及び精製	16-17
2-4. MsbA の発現及び精製	17
2-5. MsbA の包摂	17-18
2-6. MsbA の存在比の決定	18
[結果]	
2-2'. MSP のベクターの構築	19-20
2-3'. MSP の発現及び精製	20-21
2-4'. MsbA の発現及び精製	22
2-5'. MsbA の包摂	23-26
2-6'. MsbA の存在比の決定	27
[考察]	28
第三章 MsbA-ナノディスクの生化学的及び物理化学的解析	29-51
[略称]	30
[概要]	

3-1. MsbA の生化学的及び物理化学的解析	31
[方法]	
3-2. 熱安定性解析	32
3-2-1. 示差走査型熱量測定(DSC)の原理	32
3-2-2. DSC 測定	32
3-3. ATP 加水分解活性測定	33
3-4. ATP との相互作用解析	34-35
3-4-1. 等温滴定型熱量測定 of 原理	34
3-4-2. ITC 測定	34-35
3-5. 膜の流動性の測定	35-37
3-5-1. アニソトロピー	35-36
3-5-2. 膜のアニソトロピー	36
3-5-3. MsbA-ナノディスクのアニソトロピー測定	37
3-6. 異なる脂質を用いた解析	37
[結果]	
3-2'. DSC 測定	38-39
3-3'. ATP 加水分解活性の酵素速度論解析	40-41
3-4'. ITC 測定	41-43
3-5'. MsbA-ナノディスクのアニソトロピー測定	44-45
3-6'. 異なる脂質を用いた解析	46-47
[考察]	48-51
第四章 MsbA-ナノディスクの応用的利用法	52-73
[略称]	53
[概要]	
4-1. MsbA-ナノディスクの応用的利用法	54
[方法]	
4-2. SPR による蛋白質の相互作用測定 of 原理	55
4-3. 様々な脂質による MsbA の包摂	56
4-4. ATP- γ -S との結合解析	56
4-5. MSP1 への Avi タグ、システインの導入	56-57
4-6. MSP1AviC の発現、精製	57

4-7. BirA の発現、精製	57-58
4-8. MSP1AviC の Cy3 化、ビオチン化	58-59
4-9. MSP1AviC を用いた MsbA の包摂	59
4-10. MSP1AviC-MsbA の DNA origami への固定化	59-60
4-11. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の観察	60
4-12. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の酵素活性測定	60-61
[結果]	
4-3'. 様々な脂質による MsbA の包摂	62
4-4'. ATP- γ -S との結合解析	63-64
4-5'. MSP1 への Avi タグ、システインの導入	64
4-6'. MSP1AviC の発現、精製	65
4-7'. BirA の発現、精製	66
4-8'. MSP1AviC の Cy3 化、ビオチン化	67
4-9'. MSP1AviC を用いた MsbA の包摂	68
4-10'. MSP1AviC-MsbA の DNA origami への固定化	69-70
4-11'. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の観察	70
4-12'. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の酵素活性測定	71
[考察]	72-73
 第五章 総括	 74-77
 補足資料	 78-107
参考文献	108-116
謝辞	117-118

第一章

序論

1-1. 膜蛋白質研究における課題

膜蛋白質とは細胞膜の脂質二重膜中に存在する蛋白質である。膜蛋白質は全蛋白質の約 30%を占め、また現在の医薬品の半分以上のターゲットとなっている。さらに、膜蛋白質は細胞内外との物質のやり取り、エネルギー生産、シグナルの伝達や細胞接着など様々な機能を担っていることなどから重要な研究対象である(1-3)。しかしながら、膜蛋白質は一般にその発現量は少なく、また、生体膜の構成成分である脂質非存在下では凝集しやすいため発現、精製、解析が困難であった。これは膜蛋白質が細胞内の大きな部分を占める核質や細胞質ではなく、膜という平面的な部分に存在するためにその発現量は少なくなり、また、生体膜は疎水的な環境であるため脂質非存在下の水溶液中では疎水性残基が溶媒に露出してしまい凝集しやすくなるからである(4-5)。発現量に関しては近年無細胞発現系やカイコなどを用いた発現系の開発などにより徐々に改善されつつある(6-7)。また、擬似的な生体膜を模倣する環境を作り出す技術によって解析は行われている。しかし、従来の手法では生化学的性質や物理化学的性質の定量的な評価には限界があった。

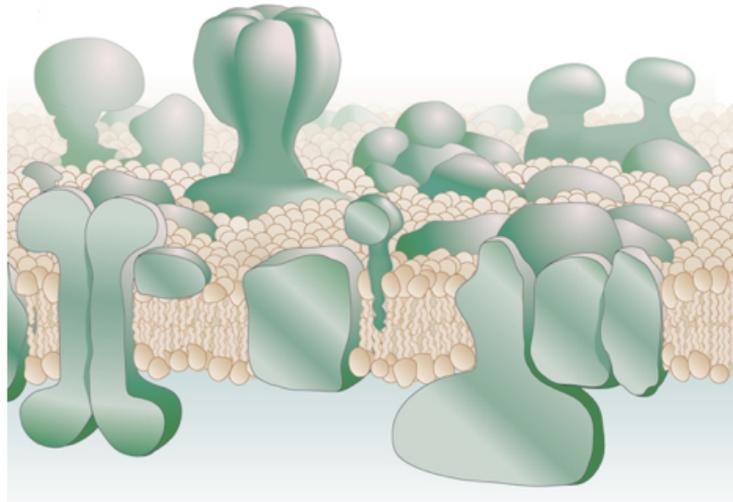


図 1-1：膜蛋白質

1-2. 擬似生体膜を用いた膜蛋白質の評価

生化学的性質や物理化学的性質の定量的な評価はその蛋白質の機能を理解する上で非常に重要であるが、膜蛋白質解析の従来の手法には限界があった。これは安定かつ均一な膜蛋白質試料の調製に問題があったからである。膜蛋白質の解析を行うための擬似生体膜として従来では界面活性剤やリポソームが用いられてきた。しかし、界面活性剤は生体膜の成分である脂質とは物性が異なるため膜蛋白質の機能を損なうおそれがあるなどの問題があった。リポソームでは対象となる膜蛋白質が次項の図 1-2 のように外側、内側を向いたりなどとその

配向を制御することが難しく、また、リポソーム内に包摂される膜蛋白質の数を制御することも難しいので均一な試料の調製が困難である(8-10)。また、リポソームはその大きさによって曲率が変わるため膜蛋白質に様々な影響を与えることが知られているがリポソームの大きさをナノメートル単位で制御することは困難である(11)。

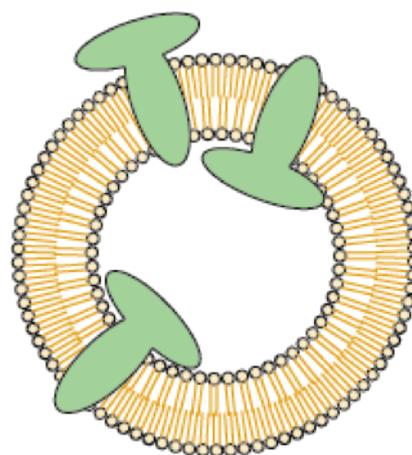


図 1-2：リポソーム

近年開発されたナノディスクによってこれらの問題点は解決された。ナノディスクは、次項の図 1-3 のように脂質とアポリポ蛋白質の一種である Membrane Scaffold Protein(MSP)二分子とが複合体を形成し膜蛋白質を安定に可溶化することができる。また、円盤状であるためにリポソームのような外側、内側という区別が存在せず、大きさが膜蛋白質の単量体や二量体程度の大きさであるため包摂される分子種を単量体や二量体に限定できるなど膜蛋白質の均一な試料調製も可能である(12-17)。さらに、ナノディスクはその構成成分である MSP の種類を変えることで円盤の半径を容易に変えることができる(18)。つまり、ナノディスクは膜蛋白質に関して界面活性剤やリポソームなどに比べて安定で均一な膜蛋白質試料の習得が可能となり、それを用いて膜蛋白質の生化学的活性や物理化学的性質の定量的評価が可能になると考えられる。

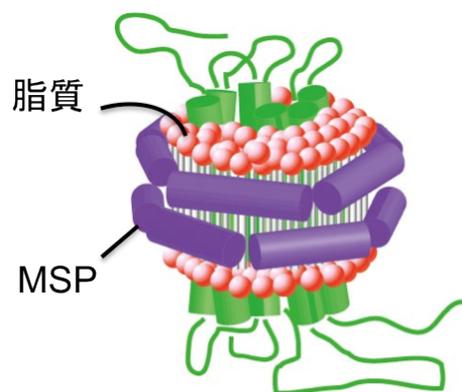


図 1-3：ナノディスク

1-3. ナノディスクを用いた膜蛋白質の研究

ナノディスクは上述したように安定で均一な試料の調製が容易であるため、それを用いて様々な解析が行われてきた。例えばトランスロコンである SecYEG の構造解析が行われたり(19)、ロドプシンを用いたシグナル伝達の解析が行われたり(20-21)、ナノディスクに含まれる分子数を制御して SNARE 蛋白質の相互作用の解析が行われてきた(22-23)。しかしながら、ナノディスクの大きさと膜蛋白質の活性の相関は不明であった。

1-4. 本研究の目的

本研究ではナノディスクの大きさと膜蛋白質の活性の相関を明らかにする。そのためにモデル膜蛋白質として大腸菌由来の ABC トランスポーターである MsbA を 4 つの大きさに包摂し生化学的性質や物理化学的性質の定量的評価を行い、ナノディスクの大きさがどのように膜の状態を変化させ膜蛋白質の活性に影響を与えるかを解析する。

1-5. MSP

前述した MSP はヒト由来のアポリポタンパク質である ApoA-1 を鋳型に遺伝子を人工的に加工することによって構築された蛋白質である(24)。ApoA-1 は図 1-4 に示した構造の蛋白質でヒトの体内では脂質と円盤状や球場の複合体を形成しコレステロールをその中に取り込み輸送する働きを担っている。MSP はこの ApoA-1 の N 末端側の 43 残基を取り除き脂質との結合ドメインのみを取り出した配列をしている。MSP1 は天然の ApoA-1 とは異なり大きさの揃った脂質との複合体を形成する。この MSP1 の α ヘリックスを形成する特定の残基を更に追加することや取り除くことによって形成されるナノディスクの大きさが変化するということが知られている(18)。

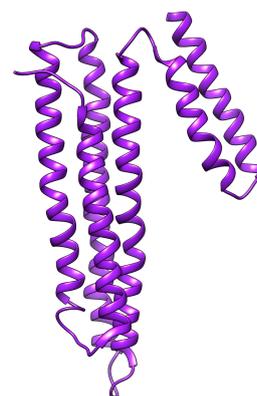


図 1-4 : ApoA-1 の構造

1-6. MsbA

グラム陰性菌の包膜は内膜、ペリプラズム、外膜から構成されておりさらにその外側にはリポ多糖類が結合している。このリポ多糖類と外膜とを結合させている Lipid A は細菌の生育には必須であり ABC(ATP-binding cassette) トランスポーターである MsbA は次項の図 1-5 のように ATP の加水分解によるエネルギーを利用してこの Lipid A を内膜の内側から外側へと輸送する(25-29)。ABC トランスポーターは物質の輸送を行うという役割を担っているため分子内又は分子間に空隙が存在する 경우가多く細胞に薬剤を投与してもこの空隙を通過して排出されてしまう(30)。MsbA はこういった多剤耐性 ABC トランスポータ

一の構造類似体なので MsbA の機能解析を行うことは薬剤開発にとって重要である(31)。しかしながら MsbA の膜成分との相互作用がどのように ATP 加水分解活性に影響を与えるかは不明であるため本研究ではナノディスクのサイズという膜成分を変化させて解析を行う。

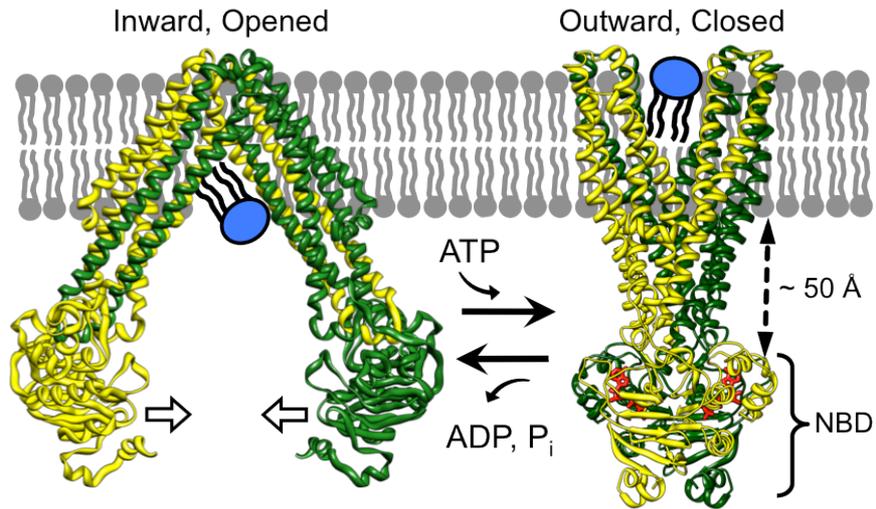


図 1-5 : MsbA

1-7. 本論文の構成

本論文ではまず一章で序論について述べ、二章において MsbA を包摂したナノディスクの精製について、三章で得られた試料の生化学的及び熱力学的解析について、四章で応用的利用法について述べ、最後に五章で総括を行う。

第二章

MsbA-ナノディスクの精製

[略称]

E1 : MSP1E1

E2 : MSP1E2

E3 : MSP1E3

MSP : MSP1、MSP1E1、MSP1E2、MSP1E3

Km : kanamycin

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

β -ME : 2-mercaptoethanol

Buffer A : 40 mM Tris / HCl、300 mM NaCl、pH 8.0

IMAC : 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー

DDM : *n*-dodecyl - β - D - maltoside

MsbA Buffer : 20 mM Hepes / NaOH、200 mM NaOH、5 mM MgCl₂、
7 mM 2-mercaptoethanol、pH 7.4

DTT : dithiothreitol

DMPC : 1, 2 - dimyristoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DP(9 : cis)PC : 1,2 - dipalmitoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DOPC : 1,2 - dioleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DM(9 : cis)PC : 1, 2 - dimyristoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

ND Buffer : 10 mM Hepes / NaOH、100 mM NaCl、pH 7.4

[概要]

2-1. MsbA-ナノディスクの精製

ナノディスクは Membrane scaffold protein (MSP) と呼ばれるアポリポ蛋白質とリン脂質で構成される。また、前述した通りこの MSP の種類を変えることでナノディスクの半径を変えることができる(18)。そこで第二章では 4 つのサイズのナノディスクを用いた MsbA の包摂及び精製法について記述する。まずアポリポタンパク質としてナノディスクサイズの小さいものを作る順に MSP1、MSP1E1、MSP1E2、MSP1E3 (以下 MSP1、E1、E2、E3、4 つ全てを指す場合は MSP とする) のベクターを構築しその発現、精製を行った。次に、包摂する膜蛋白質である MsbA の発現、精製を行った。それらを用いてリン脂質と混合、混合溶液から界面活性剤のみを除去することで 4 種類のサイズの MsbA が包摂されたナノディスク(MsbA-ナノディスク)を精製した(MSP1 で包摂した場合には MSP1-MsbA のように記載する)。

[方法]

2-2. MSP のベクターの構築

MSP1 のベクターマップは以下に示す通りである。これを鋳型に塩基挿入を行い E1、E2、E3 を構築する。

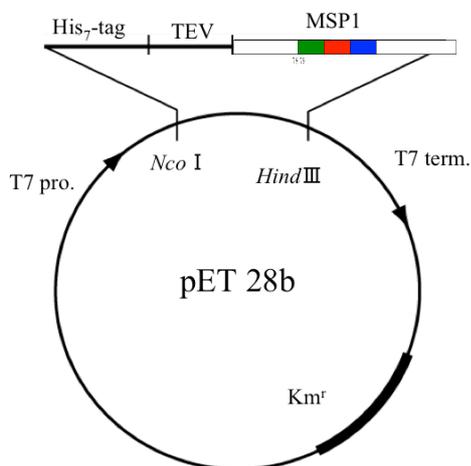
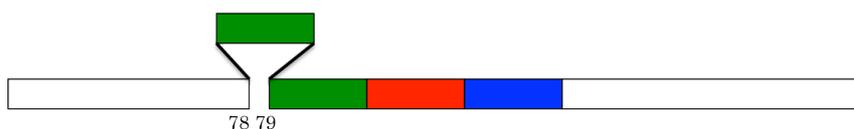


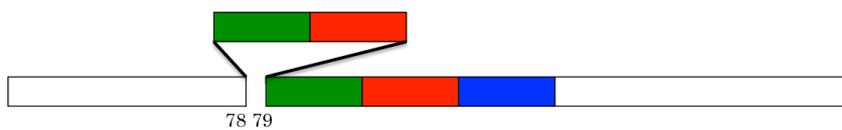
図 2-1 : MSP1 のベクターマップ

次項に E1、E2、E3 の配列のイメージ図を示す。

E1



E2



E3

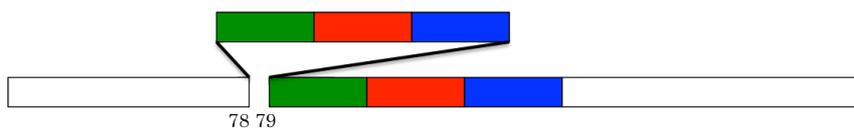


図 2-2 : E1、E2、E3 の配列のイメージ図

色付きのブロックはそれぞれ異なる 22 残基を表しており E1 では緑色の 22 残基が繰り返され、E2 では緑色と青色の計 44 残基が繰り返され、E3 では緑色と青色と濃青色の計 66 残基が繰り返されている。

この繰り返し配列はその配列内に制限酵素の切断部位が存在しないために通常の遺伝子組み換え操作では作製することができない。そこで、E1 では TOYOBO 社の Mutagenesis Kit を使用した部位特異的変異導入で塩基挿入を繰り返すことにより MSP1 を鋳型に 22 アミノ酸残基、すなわち 66 核酸塩基の DNA 挿入を行った。E2 は同様に E1 を鋳型に 22 残基、66 塩基の DNA 挿入を行った。E3 では通常の遺伝子組み換えと同様に制限酵素の切断部位を付けた DNA 断片を PCR 法により作製、DNA 連結反応により DNA 同士を繋げる。そして次項の図のように制限酵素の切断部位を部位特異的変異導入によって片方ずつ削除した。

しかし、どちらの方法にも共通していることとして繰り返し配列であるために通常のプライマーを設計してもプライマーが次項の図のように二カ所にアニーリングしてしまい PCR を行っても単一の DNA 断片を得ることが出来ない。これを避けるためにコドンを変えたプライマーを用意した。

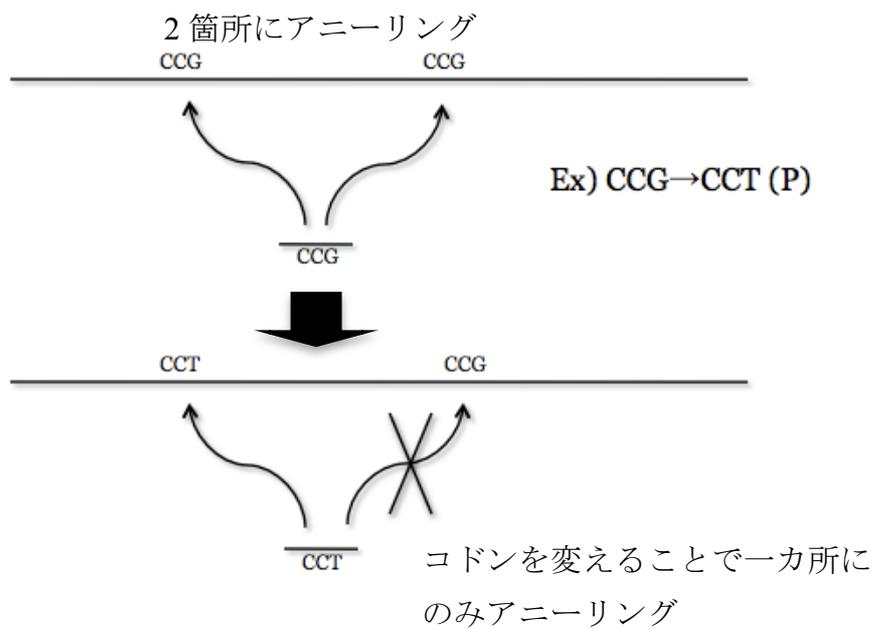
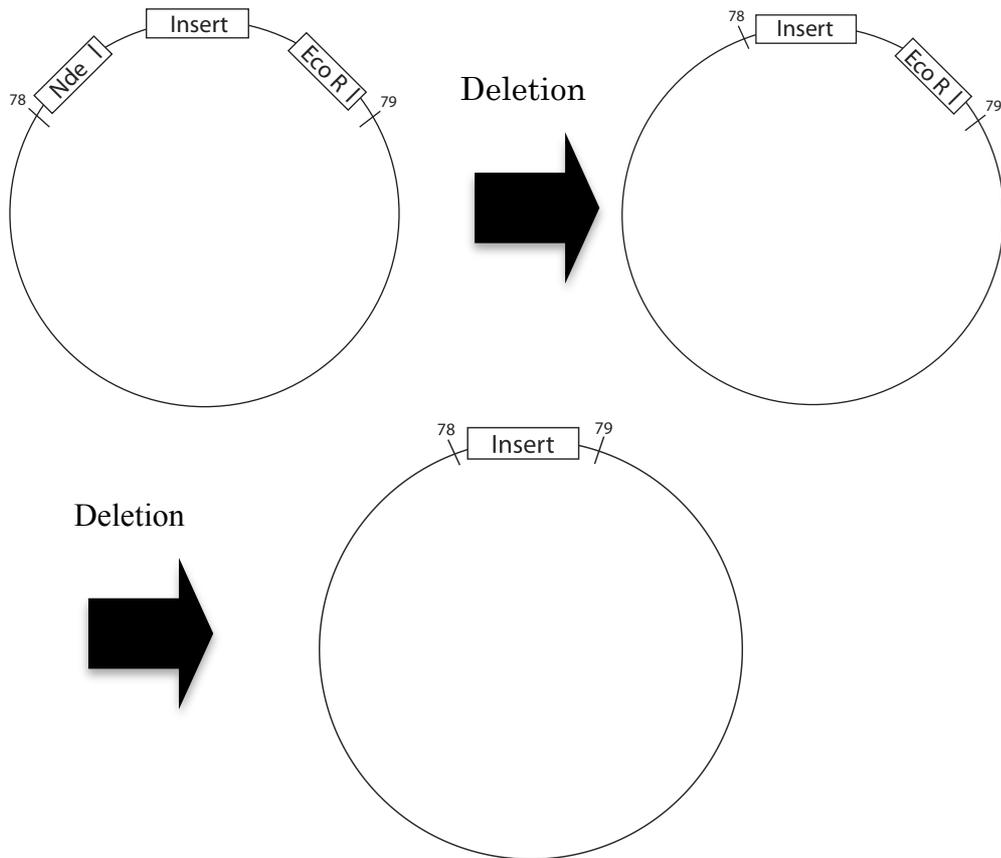


図 2-3 : E1、E2、E3 を構築するための遺伝子工学の概略

2-3. MSP の発現及び精製

MSP は全て以下の様に発現、及び精製を行った。

大腸菌 C43(DE3)を使用して LB プレート培地(カナマイシン(Km) : $50 \mu\text{g/ml}$) に形質転換をした。37 °C、LB 培地で培養して O.D.₆₀₀ ~ 0.6 で IPTG を終濃度 1mM になるように加えた。37 °C のまま約 5 時間培養した後 7000×g、10 分、4°C で遠心をして集菌した。40 mM Tris / HCl、300 mM NaCl、pH 8.0 (以下 Buffer A) で菌体を懸濁し菌体を超音波破碎した。その後 1% Triton として 40,000×g、30 分、4 °C で遠心をして上清を回収し金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) で精製を行った(クロマトグラフィーシステム : GE ヘルスケア、AKTA システム:以下クロマトグラフィーには特に記載のない場合この装置を使用した。使用カラム : His Trap HP 5 ml)。IMAC での精製法の概略を以下に示す。

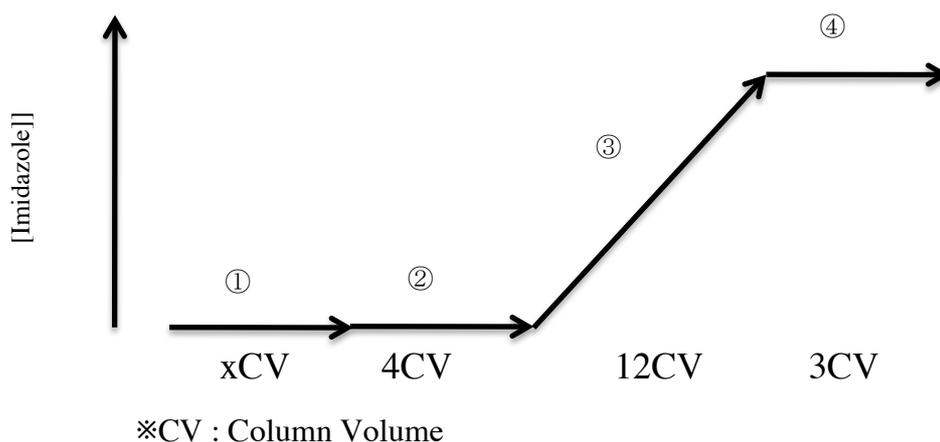


図 2-4 : IMAC の精製

- ① : サンプル
- ② : Buffer A + 30 mM Sodium cholate
- ③ : ② + ④ (Gradient)
- ④ : Buffer A + 30mM Sodium cholate + 300 mM Imidazole

次に、この③の溶出画分のうち純度の高いものを回収し限外ろ過による濃縮、希釈を繰り返すことにより Buffer を Buffer A + 5 mM Sodium cholate に置換した。その後 MSP : TEV プロテアーゼ = 30 : 1 になるように TEV プロテアーゼを加え約 12 時間室温で振盪し HisTag を切断した。再度 IMAC により最終精製を行った (使用カラム : GE ヘルスケア、His Trap HP 5ml)。TEV プロテア

一ゼには HisTag がついており切断したサンプルには切断された MSP、未切断の MSP、TEV プロテアーゼ、比較的カラムに吸着しやすい夾雑物が含まれるのでもう一度 IMAC を行うと目的の切断された MSP のみが Flow Through に溶出される。

2-4. MsbA の発現及び精製

MsbA の発現及び精製を次のように行った。ベクターには pET26b を用いた。菌株には膜蛋白質を発現するのに適している大腸菌 C43(DE3)を使用し LB プレート培地に形質転換(Km : 50 μ g/ml)した。その後 37°C、LB 培地で培養し O.D.₆₀₀~0.6 で IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加えた。その後約 5 時間 37°C で培養し 7000g、4°C、10 分で集菌した。20 mM Hepes / NaOH、200 mM NaOH、5 mM MgCl₂、7 mM 2-mercaptoethanol (β -ME)、pH 7.4(MsbA Buffer) で菌体を懸濁し French Press で 1 kbar の圧力で破砕した。9200 g、4°C、30 分で遠心し上清を回収し 150,000 g、4°C、1 時間で超遠心を行った。沈殿を MsbA Buffer で再度懸濁して *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) を終濃度 1% になるように加え可溶化した。その後 IMAC で精製を行った(使用カラム : TALON Metal Affinity Resin)。

IMAC における精製では以下の溶液で溶出した。

Wash 1 : MsbA Buffer + 0.02% DDM + 5 mM Imidazole

Wash 2 : MsbA Buffer + 0.02% DDM + 10 mM Imidazole

Elution : MsbA Buffer + 0.02% DDM + 300 mM Imidazole

その後 Elution 画分をサイズ排除クロマトグラフィーによって最終精製した。(使用カラム : Superdex 200 26 / 60 pg、Buffer : MsbA Buffer + 0.02% DDM、還元剤には 7 mM β -ME の代わりに 1 mM DTT を使用した。)

2-5. MsbA の包摂の条件検討

精製された MsbA をナノディスク一つ(MSP 二つ)に対し MsbA の機能体である二量体が一つ包摂されるように条件検討を行った。まず加える脂質の量を変化させて実験を行った。例えば MSP1 においては MSP1 と MsbA と飽和脂質である 1, 2-dimyristoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine(DMPC)をそれぞれ

れ 1 : 1 : 0、20、40、60 と変化させた。次に加える MSP の量を変化させて最適化を行った。MSP 過剰の条件で実験を行えば空のナノディスクは精製されるものの MsbA が複数包摂されることは避けられる。具体的には MSP : MsbA : DMPC= 5、2.5、1 : 1 : 200、100、40 と変化させた。それぞれの MSP について混合比の最適化を行い MsbA の包摂を行った。

混合時にはまず脂質を N₂ ガスで乾燥し、その後一晩真空乾燥を行い、Buffer A + 100 mM sodium cholate によって可溶化し終濃度 50 mM とした(1,2 - dipalmitoleoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine (DP(9 : cis)PC)を用いた時は 25 mM、1,2 - dioleoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine (DOPC)を用いた時は 12.5 mM とした)。MSP、MsbA、脂質を 15 分転移温度付近である室温で混合した。また、1, 2 - dimyristoleoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine(DM(9 : cis)PC)、DOPC を用いた場合には 4°C で混合した。その後 MSP、MsbA、脂質に含まれる界面活性剤を除去するため Bio-Beads を 0.6 g/ml となるように加えそれぞれの転移温度付近で 4 時間混合し界面活性剤を除去した。MsbA には His タグが含まれており、MSP には His タグが含まれていないため IMAC を行えば空のナノディスクは Flow through、Wash の段階で除去が可能である。溶出には Buffer A、Buffer B を使用した。溶出画分を 0.2 μm のフィルターに通しサイズ排除クロマトグラフィーで精製を行った。サイズ排除クロマトグラフィーには Superdex 200 10 / 300、10 / 300 increase、16 / 60 pg のいずれかを使用し ND Buffer (10 mM Hepes / NaOH、100 mM NaCl、pH 7.4)で溶出を行った。
※各脂質の構造は補足資料 S-1 を参照

2-6. MsbA の存在比の決定

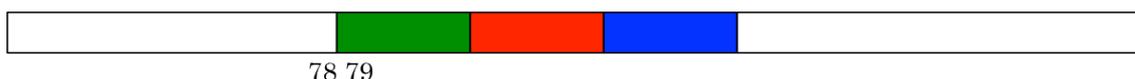
精製された MsbA-ナノディスクに含まれる MsbA の分子数は SDS-PAGE によって決定した。濃度既知の MsbA と MSP を混合しそれらのバンド強度の比を検量線として用いた。画像の解析には Image J を使用した。

[結果]

2-2'. MSP のベクターの構築

遺伝子工学の結果構築された塩基配列をアミノ酸配列に変換したものを記載する。

MSP1



MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVT
QEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEME
LYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHV
DALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLS
EKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

E1

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVT
QEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEME
LYRQKVEPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKL
HELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLE
ALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVS
FLSALEEYTKKLNTQ

E2

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVT
QEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEME
LYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPYLDDFQKKWQEEM
ELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAH
VDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTL
SEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

E3

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVT
QEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEME

LYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEMRDRARAHV
DALRTHLAPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQK
LHELQEKLSPLGEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARL
 EALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKV
 SFLSALEEYTKKLNTQ

配列中の各色はそれぞれ図：2-2 に対応しており下線部が遺伝子工学により挿入された部分である。

2-3'. MSP の発現及び精製

以下に IMAC 後の MSP の SDS-PAGE 及び Western-Blotting の結果を示す。

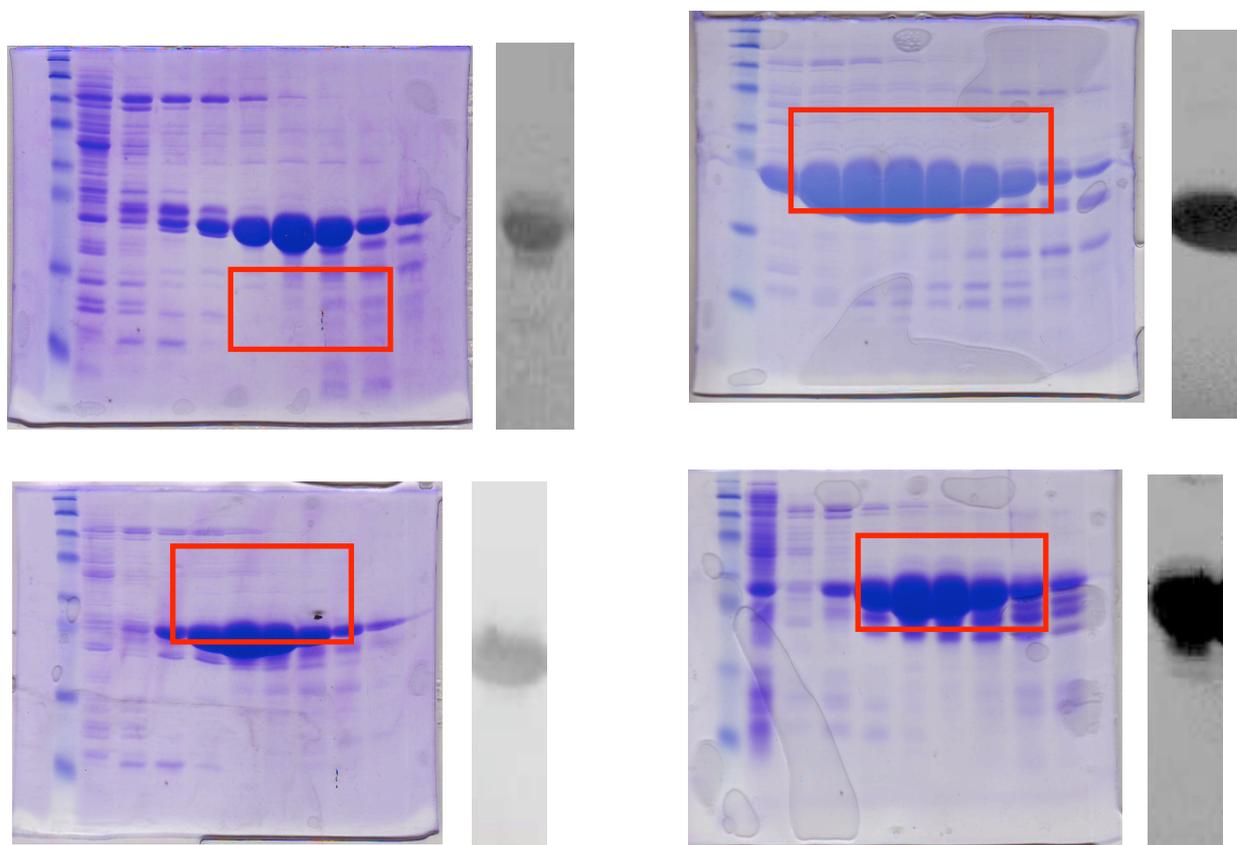


図 2-5：IMAC 後の MSP1(左上)、E1(右上)、E2(左下)、E3(右下)の SDS-PAGE 及び Western-Blotting

MSP1、E2、E3 では一番左からマーカー、Apply、Wash でそれ以外は全て溶出画分である。E1 では左からマーカー、溶出画分である。また、マーカーの分子量は上から 175、80、58、46、32、25、17、7 (kDa) である。いずれの MSP

でも正常にかつ大量に蛋白質が発現していることが確認できた。また、図の赤枠で示したサンプルを次の操作に使用した。

次に HisTag を切断し、再度 IMAC を行った時の SDS-PAGE を示す。

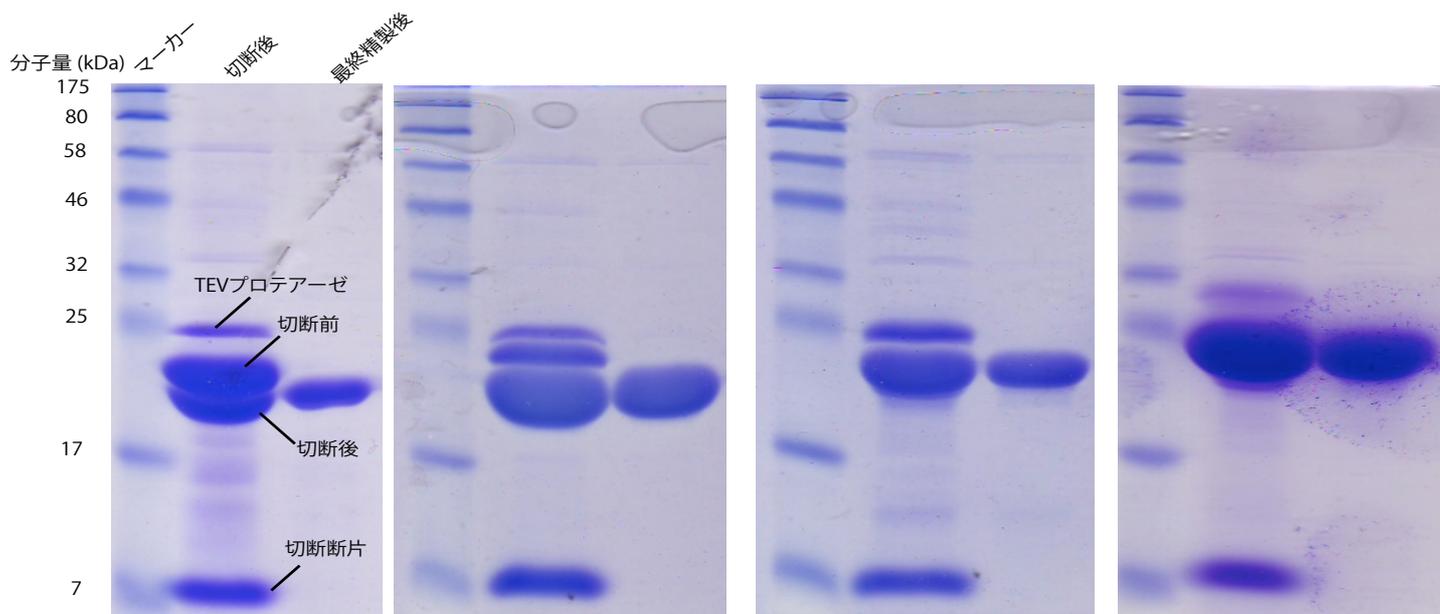


図 2-6 : MSP の HisTag 切断後の SDS-PAGE(左から MSP1、E1、E2、E3)

いずれの SDS-PAGE のゲルも左からマーカー、切断後の Apply、Flow-through(最終精製)の順となっている。図の通り MSP は切断され、高純度で精製されていることが分かる。また、E2 では切断前の E2 と TEV プロテアーゼが、E3 では切断後の E3 と TEV プロテアーゼが重なっていたためそれぞれのバンドを確認することができなかった。

2-4'. MsbA の発現及び精製

次に IMAC 後及びサイズ排除クロマトグラフィー後の MsbA の SDS-PAGE 及びクロマトグラムの図を示す。

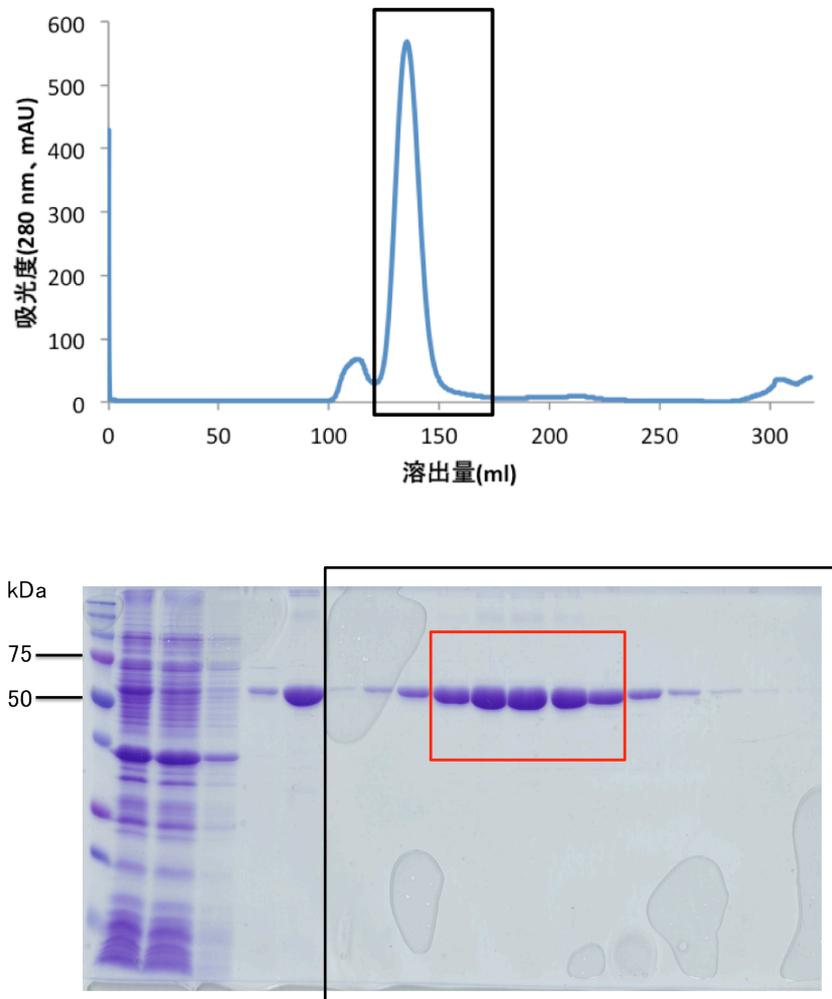


図 2-7 : MsbA のクロマトグラム及び SDS-PAGE

左から Apply、Flow through、Wash1、Wash2、Elution となりその後はクロマトグラムにおいて黒枠で示した画分である。MsbA は約 64kDa なので MsbA は確かに精製された。また、SDS-PAGE の赤枠で示した画分を液体窒素で凍らせ-80℃で冷凍保存した。

2-5'. MsbA の包摂の条件検討

次に MSP1 における脂質の混合比の最適化を行ったサイズ排除クロマトグラム及び 40 当量加えた時の SDS-PAGE を示す。混合比は MSP1 : MsbA : DMPC = 1 : 1 : x となっておりグラフ中の数字が x に対応する。また、MSP1-Empty とは MsbA の包摂されていない MSP1 と DMPC で構成されるナノディスクを表している。

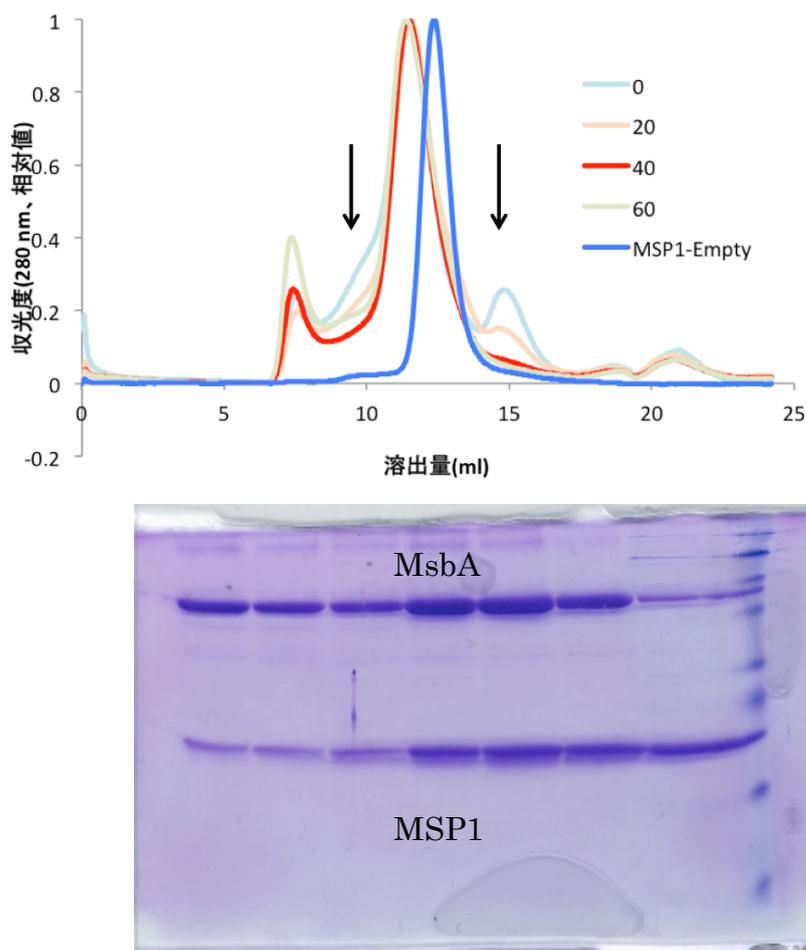


図 2-8 : MSP1 を用いた場合のクロマトグラム及び SDS-PAGE

クロマトグラムより全ての比率において MsbA を含まない空のナノディスクよりも高分子量側へピークがシフトしたことが確認された。また、SDS-PAGE によって MSP1 と MsbA が同時に溶出されたことから MsbA のナノディスクへの包摂を確認した。脂質を全く含まない条件でもピークシフトは確認されたがこの時には混合時においてすでに試料の凝集による白濁が確認された。脂質を 40 当量加えた時が矢印で示した高分子量、低分子量側のコンタミネーションが

最も少なかったので以降の実験では 40 等量加えることにした。

※他の MSP については補足資料 S-2 を参照

次に、MSP1 の比率を変化させた時のクロマトグラムを示す。グラフの数字は MSP1 : MsbA : DMPC = x : 1 : 40x とした時の x を表している。

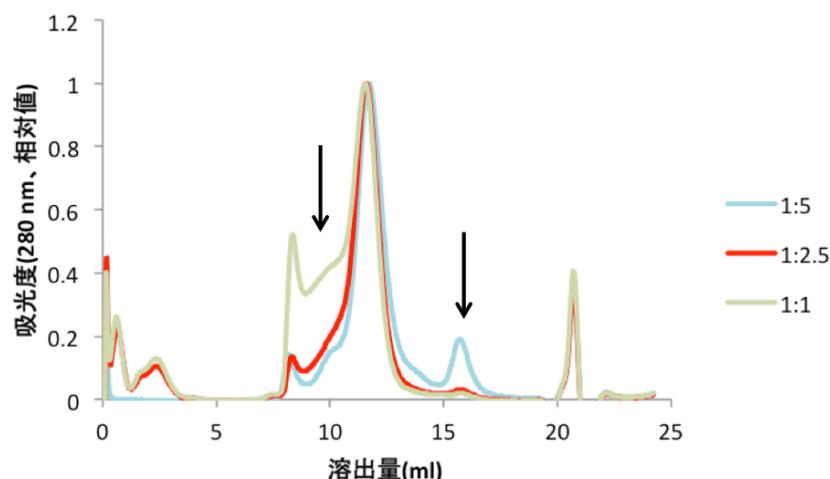


図 2-9 : MSP1 を変化させた場合のクロマトグラム

全ての比率において前項とほぼ同じ位置にピークが観察された。加える MSP を少なくすると高分子量側に見える凝集体が増え、多くし過ぎると低分子量側にコンタミネーションが見られたので以降の実験では 2.5 等量加えることとした。E1、E2 に関しては 2.5 等量、E3 に関しては 5 等量加えることとした。

※E3 については補足資料 S-3 を参照

次に最適化を行った後の混合比を示す。

表 2-1 : 各 MSP における混合比の最適条件

	MSP	MsbA	DMPC
MSP1	2.5	1	100※
E1	2.5	1	165
E2	2.5	1	235
E3	5	1	600

※DM(9 : cis)PC、DP(9 : cis)PC、DOPC についても

MSP1 : MsbA : DMPC = 2.5 : 1 : 100

の条件で実験を行った。

次に最適化された条件下でのクロマトグラム及び SDS-PAGE を示す(DM(9 : cis)PC、DP(9 : cis)PC、DOPC に関しては補足資料 S-4 を参照)。

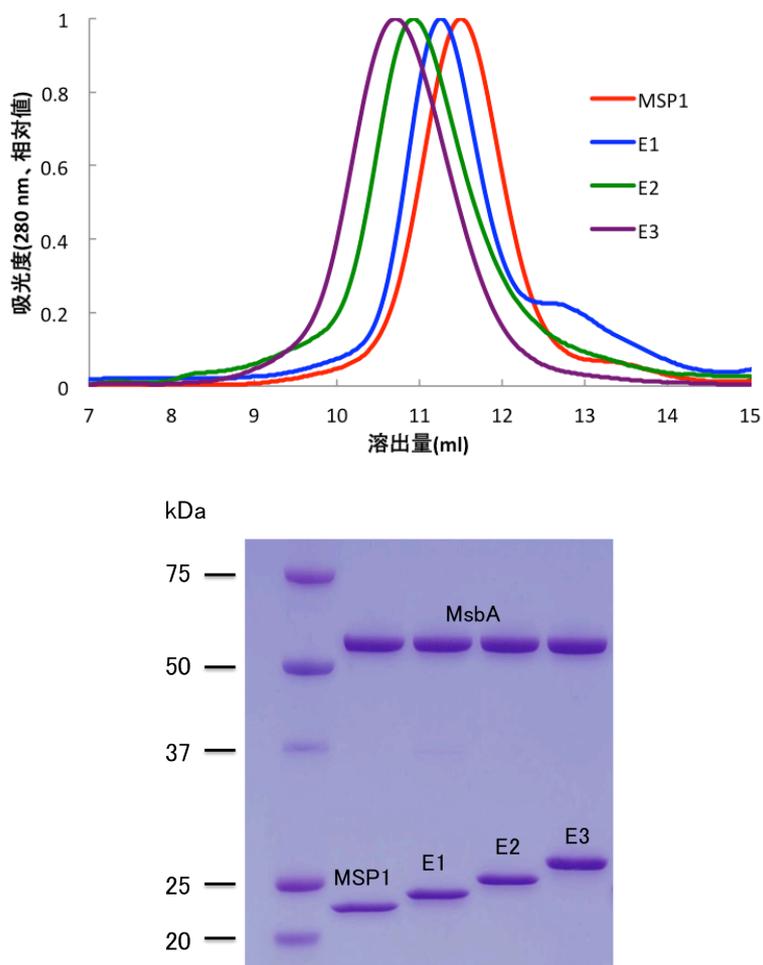


図 2-10：各 MSP における最適化されたクロマトグラム及び SDS-PAGE

全ての MSP、脂質を用いてもほぼ対称的なピークを確認することが出来た。SDS-PAGE において MsbA と MSP が同時に溶出されたことから全ての MSP において MsbA は包摂されたことが確認された。得られたクロマトグラムから分子量マーカーによって算出された検量線を元にそれぞれの分子量及び直径を計算すると

MSP1 : 270 kDa, 11.3 nm

E1 : 300 kDa, 11.6 nm

E2 : 352 kDa, 12.0 nm

E3 : 390 kDa, 12.3 nm

となった。混合比から算出された計算値を以下に示す。

$$\begin{aligned} \text{MSP1} &: 23.3(\text{MSP1 の分子量}) \times 2(\text{ナノディスクに含まれる MSP1 の分子数}) \\ &+ 64.5(\text{MsbA の分子量}) \times 2(\text{ナノディスクに含まれる MsbA の分子数}) \\ &+ 0.678(\text{DMPC の分子量}) \times 80(\text{ナノディスクに含まれる DMPC の分子数}) \\ &= 230 \text{ (kDa)} \end{aligned}$$

同様に

$$\text{E1} : 26.2 \times 2 + 64.5 \times 2 + 0.678 \times 132 = 271 \text{ (kDa)}$$

$$\text{E2} : 28.8 \times 2 + 64.5 \times 2 + 0.678 \times 188 = 314 \text{ (kDa)}$$

$$\text{E3} : 26.2 \times 2 + 64.5 \times 2 + 0.678 \times 240 = 354 \text{ (kDa)}$$

実測値はこの値よりやや高いがこれはクロマトグラムから算出された値は球状近似をしているため円盤状であるナノディスクでは実測値のほうが高い値が得られたと考えられる。

2-6'. MsbA の存在比の決定

次に MSP1 におけるサイズ排除クロマトグラフィー後の SDS-PAGE 及びバンド比から求めた検量線、そして次項に各 MSP を用いたナノディスクに含まれる MsbA の分子数を示す。

※他の MSP、DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC については補足資料 S-5、S-6 を参照)

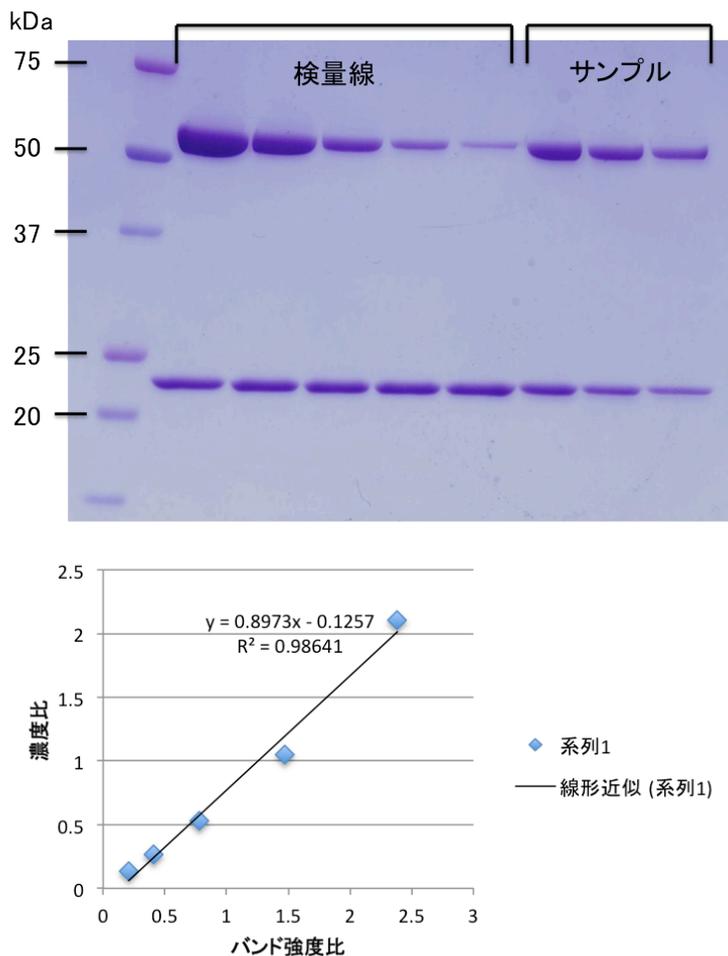


図 2-11：MSP1 における包摂される MsbA の分子数の決定

表 2-2：各 MSP における包摂された MsbA の分子数

	MSP1	E1	E2	E3
MsbA / ナノディスク	2.04	2.06	2.18	2.00

ほぼ全てのナノディスクにおいて一つのナノディスクに一つの MsbA 機能体 (二量体) が含まれていることが確認された。

※DM(9 : cis)PC、DP(9 : cis)PC、DOPC に関しては補足資料 S-5、S-6 を参照

[考察]

本章ではまず MSP、次いで MsbA の精製を行った。それらを用いて MsbA のナノディスクへの包摂や精製の条件検討を行った。サイズ排除クロマトグラフィーにより何も包摂されていない空のナノディスクよりも高分子量側へピークがシフトした。このことと SDS-PAGE により MsbA と MSP が同時に溶出されたことから MsbA のナノディスクへの包摂を確認した。脂質や MSP との混合比を工夫することによって凝集体等のコンタミネーションを抑えることにも成功した。アポリポタンパク質は二分子以外でも脂質と複合体を形成することが知られているので、これらのコンタミネーションは MsbA がこのような複合体に取り込まれたものと考えられる(65)。また、ほぼ対称的なピークが得られたことから MSP を用いて均一なサンプルの取得に成功したと言える。クロマトグラムより得られた分子量と計算から得られた分子量がほぼ一致していたことから得られたサンプルは MsbA を包摂したナノディスクであることが確認された。また、ナノディスクに含まれる MsbA の分子数を SDS-PAGE により測定したところ全ての大きさのナノディスクに一つの MsbA 機能体である二量体が包摂されていたことから MsbA は機能体単位で正しく包摂されていたことがわかる。この二量体の MsbA は、単量体が同じ向きと逆向きの両方の向きを向いている場合と、二つの MsbA が同じ向きを向いている場合の 2 つの可能性が考えられる。しかしながら、図 1-4 の結晶構造から分かる通り MsbA 二量体において膜貫通領域は互いの膜貫通領域と相互作用しながら存在しているので本研究において包摂された MsbA の二量体は別々の向きを向いているのではなくそれぞれ同じ向きで包摂されたということが出来る(29)。

第三章

MsbA-ナノディスクの 生化学的及び物理化学的解析

[略称]

DSC : Differential Scanning Calorimetry

ND Buffer : 10 mM Hepes / NaOH、100 mM NaCl、pH 7.4

DDM : *n* - dodecyl - β - D - maltoside

AMPPNP : Adenosine 5' - (β , γ - imido)triphosphate lithium salt hydrate

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

DMPC : 1, 2 - dimyristoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DM(9:cis)PC : 1, 2 - dimyristoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DP(9:cis)PC : 1,2 - dipalmitoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DOPC : 1,2 - dioleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

12-AS : 12-(9-anthroyloxy)stearic acid

[概要]

3-1. MsbA の生化学的及び物理化学的解析

蛋白質の生化学的活性や物理化学的性質の定量的評価はその蛋白質を理解する上で重要である。しかし、従来、膜蛋白質の定量的評価は困難であった。定量測定には試料の均一性が重要であるが従来の技術では均一な膜蛋白質試料の調製が困難であった。本章では前章において均一化された MsbA-ナノディスクを用いて MsbA の生化学的及び物理化学的性質の定量的評価を行った。MsbA は大腸菌由来の ABC トランスポーターであり ATP の加水分解を利用して基質である Lipid A を大腸菌の内膜から外膜へと輸送する(25-29)。MsbA の加水分解は変異体を用いた解析や加水分解領域のみを取り出した解析などの報告があるが(32-33)、膜成分に着目した解析は現在のところなされていない。本章ではナノディスクの大きさといった膜成分が MsbA の ATP との相互作用に与える影響について解析を行う。

[方法]

3-2. 熱安定性解析

3-2-1. 示差走査型熱量測定(Differential Scanning Calorimetry(DSC))の原理

示差走査型熱量測定とは温度上昇に伴う基準試料と測定試料の熱量の変化を測定する方法のことであり、蛋白質のアフォールディング解析などの熱安定性の解析によく用いられる(34-36)。蛋白質の測定を行う際は基準試料と測定試料は同一の Buffer を使用する。基準試料、測定試料の両方に熱を加えると温度上昇に伴う熱変性プロセスにおいて測定試料における熱の吸収量が増加するため基準試料との間に温度差が生じる。

この温度差を解消するために基準試料にこの変性プロセスの熱容量に比例する熱が加えられる。この熱を測定試料の濃度などで補正すると図 3-1 に示したような吸熱ピークが得られる。この吸熱ピークから測定試料の変性中点 (T_m)、吸熱ピークを積分することによって変性エンタルピー (ΔH)、変性前後の熱容量の差から変性の熱容量変化 (ΔC_p)を求めることができる。

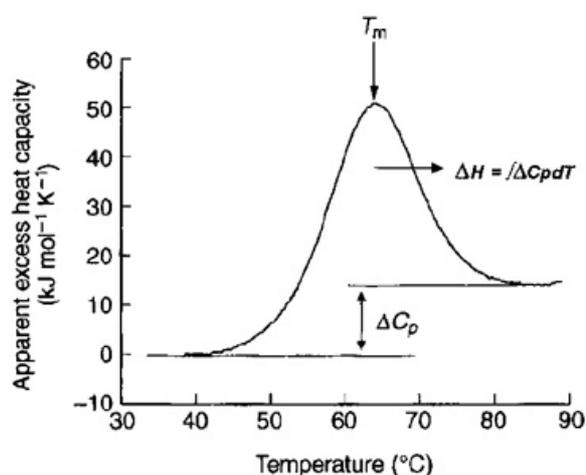


図 3-1 : DSC カーブの例※

※図は GE ヘルスケア、

http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/dsc_app.html より抜粋

3-2-2. DSC 測定

前章において得られた MsbA-ナノディスクの安定性を示差走査型熱量測定によって測定した。この時試料の終濃度はそれぞれ 20~50 μ M とした。測定には ND Buffer を使用した(DDM の場合には ND Buffer + 0.02% DDM を使用した)。ATP の非加水分解性アナログである AMPPNP を用いてリガンド結合時の熱安定性の測定も行った。AMPPNP を使用した際には ND Buffer + 10 mM $MgCl_2$ を使用し MsbA に対して 20 等量加えた。

(使用装置 : GE ヘルスケア社、MicroCal VP-DSC)

3-3. ATP 加水分解活性測定

MsbA は ATP 加水分解酵素であるので ATP 加水分解活性の酵素速度論解析を行うことによりリガンドである ATP への親和性や触媒能を評価することが可能となる。ATP 加水分解活性測定は以下のように行った。S Buffer(下記参照)250 μ l に MsbA を 2.5 μ g(DDM の時は 25 μ g) 加え MiliQ で合計 500 μ l とし氷上で 10 分間静置した。その後 37°C で 10 分間静置し以降 5 分毎にサンプルを 75 μ l ずつ分取した。分取したサンプルは 75 μ l の 12% SDS で反応を停止し、Buffer 1 を 150 μ l 加え 5 分間静置し Buffer 2 を 225 μ l 加えた。その後 20 分間静置し 850 nm の吸光スペクトルを測定した。基質である ATP 濃度を変化させて酵素速度論解析を行いミカエリス・メンテン式より V_{max} 、 k_{cat} 、 K_M 、 k_{cat} / K_M を算出した。各 Buffer の組成は以下の通りである。

S Buffer(※1) : 100 mM Hepes / NaOH, 20 mM $MgCl_2$, (DDM を用いる時は 0.04% DDM,) pH 7.4, (ATP ※2)

※ 終濃度は上記の半分になる。

※ 酵素速度論解析を行った時は ATP の終濃度が 4、2、1、0.5、0.25、0.125 mM となるようにした。

Buffer 1 : 2% Ammonium molybdate, 12% Ascorbic acid, HCl 1M

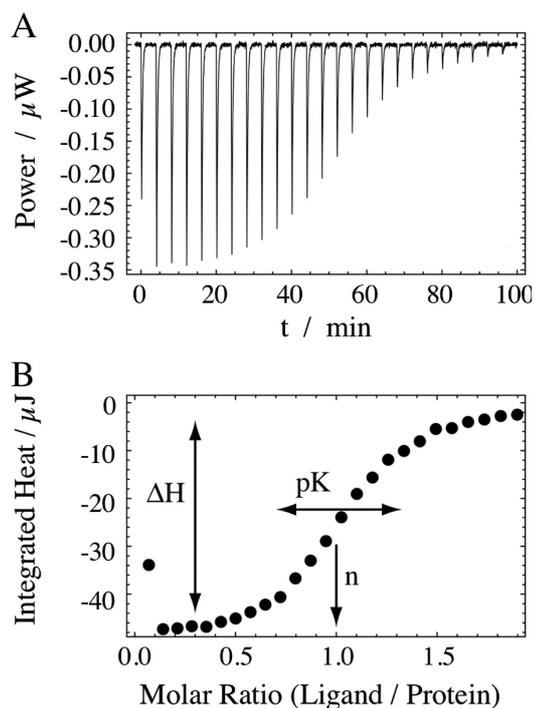
Buffer 2 : 2% Citric acid, 2% Sodium metaarsenite, 2% Acetic acid

3-4. ATP との相互作用解析

3-4-1. 等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry(ITC))の原理

等温滴定型熱量測定とは一定温度下で滴定による温度変化を測定する方法のことであり、分子間相互作用解析に用いられる(37-39)。結合に伴う熱の変化を測定することによって結合定数や結合比、エンタルピー変化やエントロピー変化などを求めることが可能である。また、反応の熱を直接測定するので標的分子への化学的修飾を必要としないため自然の状態に近い状態で測定することが可能である。

測定はリファレンスセルとサンプルセルの間の温度差を測定することによって行われる。サンプルセルにシリンジからアナライトが滴下され反応による熱が発生する。この時発生した熱によるリファレンスセルとの温度差を解消するためにサンプルセルに新たに熱が加えられる。この熱をサンプルの濃度などで補正すると図 3-2 で示すような滴定曲線を描くことが出来る。この滴定曲線から反応のエンタルピー変化(ΔH)、結合定数(K_a)、結合比(n)を算出することが可能となる。また、



$$-RT \ln K_a = \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

図 3-2 : ITC による滴定曲線の例

の式より反応の自由エネルギー変化(ΔG)、エントロピー変化(ΔS)も算出することが可能である。

3-4-2. ITC 測定

前章において得られた MsbA-ナノディスクと ATP の非加水分解性アナログである AMPPNP との相互作用を等温滴定型熱量測定により測定した。この際シリンジに AMPPNP を、セルに MsbA-ナノディスクを添加し MsbA-ナノディ

スクは約 50 μ M、AMPPNP はその 5 倍~10 倍程度の濃度で測定を行った。また、ND Buffer + 10 mM MgCl₂ を使用した。測定は DMPC の転移温度(23°C) よりやや高い 25°C で実験を行った。

(使用装置 : GE ヘルスケア、MicroCal iTC200)

3-5. 膜の流動性の測定

3-5-1. アニソトロピー

膜の流動性を測定する手法として蛍光脂質を用いた試料の定常状態のアニソトロピーを測定する手法が知られている(40-41)。アニソトロピーとは偏光の傾き具合のことであり以下のように導き出される(42-43)。

蛍光は図 3-3 のように x、y、z 軸それぞれに分布するがこれらの成分を足しあわせたものは試料から放射される全蛍光強度に比例する。この量 S は以下のように定義することが出来る。

$$S \equiv I_x + I_y + I_z \quad (1)$$

ここで図 3-3 のように z 軸方向に偏光した光を入射すると、蛍光強度は z 軸まわりに対称的に分布するため、

$$I_x = I_y \quad (2)$$

となる。これを(1)に代入すると

$$S = I_z + 2I_x \quad (3)$$

となる。次に、偏光の度合いを決めるために、以下のように I_z と I_x の差の量 D を定義する。

$$D \equiv I_z - I_x \quad (4)$$

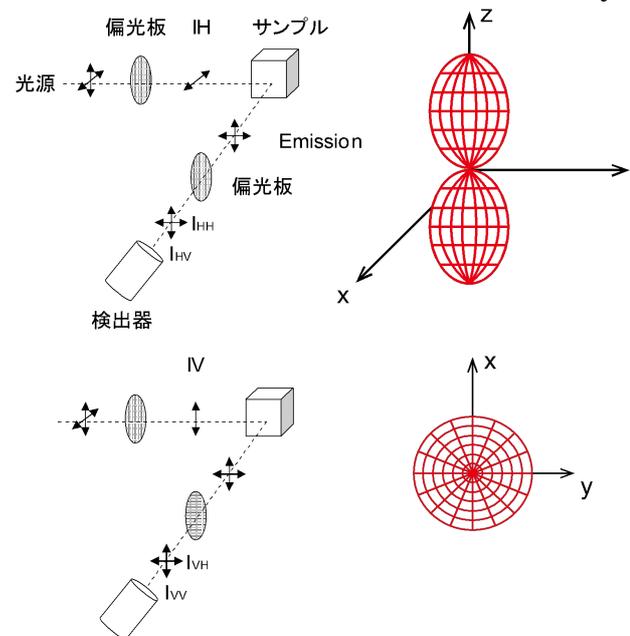


図 3-3 : アニソトロピー測定の様式図

この時蛍光の偏光が強ければ D の絶対値は大きくなり、偏光が弱ければ小さくなり、偏光が完全に解消されれば $D = 0$ となる。この偏光度 D を全蛍光強度に比例する S で規格化した量を蛍光のアニソトロピーと定義する。

$$r \equiv D / S = (I_z - I_x) / (I_z + 2I_x) \quad (5)$$

装置固有の補正因子 G で偏光強度を補正し、 I_z 、 I_x をそれぞれ入射光の偏光方向と平行及び垂直な成分と見なすと以下の式を得ることが出来る。

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (6)$$

$$I_{VV} / I_{VH} = GI_z / I_x \quad (7)$$

添字の V 、 H はそれぞれ偏光の角度を表しており、 V は **Vertical**(垂直)を H は **Horizontal**(水平)を示す。つまり I_{VV} とは垂直方向の偏光で励起した時の垂直方向の偏光成分の示す蛍光強度である。これらを(5)式に代入すると

$$r = (I_{VV} - G I_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}) \quad (8)$$

を得ることが出来る。

3-5-2. 膜のアニソトロピー

蛍光偏光は分子の回転ブラウン運動が大きくなると解消されるのでアニソトロピーの値は小さくなり、回転ブラウン運動が小さくなるとその値は大きくなる。脂質膜に蛍光物質を加えアニソトロピーを測定することによって蛍光脂質の回転ブラウン運動、すなわち膜の流動性を測定することが可能となる。また、今回使用する蛍光物質である **12-(9-anthroyloxy)stearic acid(12-AS)**は図3-4に示したように脂質膜の中心付近に蛍光団を配置するため12-ASを用いると脂質膜の表面ではなく脂質膜の中心部の流動性を測定することが出来る(44)。

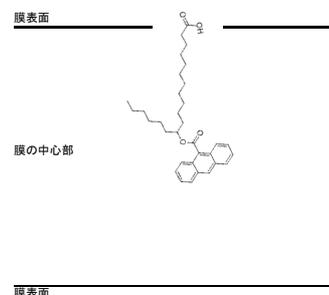


図3-4: 12-ASの位置

3-5-3. MsbA-ナノディスクのアニソトロピー測定

前章によって得られた MsbA-ナノディスクのアニソトロピーを測定した。脂質濃度は $100\ \mu\text{M}$ 、脂質と 12-AS との比は 200 : 1 として測定した。Buffer には ND Buffer と Mg^{2+} の影響を見るために ND Buffer + 10 mM MgCl_2 を使用した。AMPPNP はいずれの条件でも加えなかった。測定は室温で行い、また、励起光は 370 nm、440 nm の蛍光強度で算出した。

(使用装置 : 日本分光、FP-6500)

3-6. 異なる脂質を用いた解析

DMPC とは性質の異なる DM(9 : cis)PC、DP(9 : cis)PC、DOPC を用いて酵素速度論解析及びアニソトロピー測定を行った。

[結果]

3-2'. 熱安定性解析

以下に空のナノディスク及び MSP1 に包摂された MsbA による DSC 曲線を示す。MSP1-Empty とは MSP1 と DMPC のみで構成された MsbA の包摂されていないナノディスクのことである。

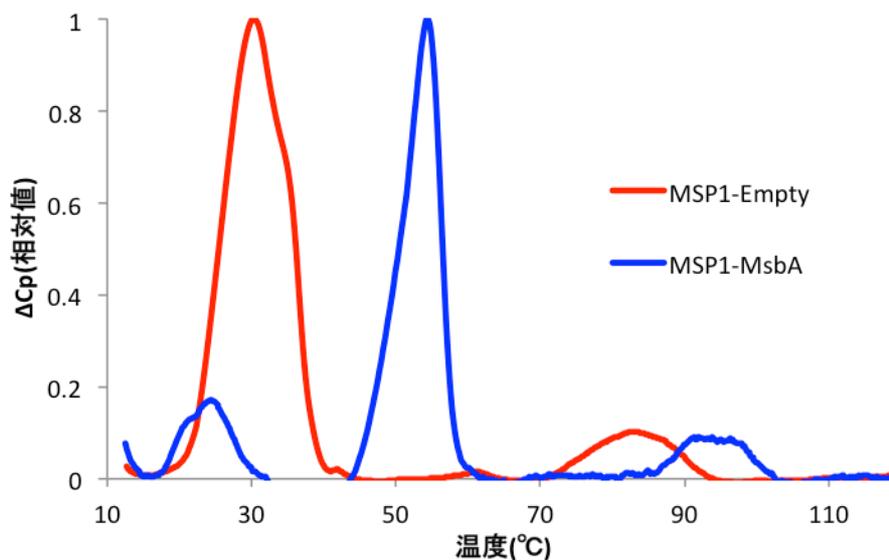


図 3-5 : MSP1-MsbA-ナノディスク、MSP1-ナノディスクの DSC 曲線

空の MSP1 のナノディスクのグラフでは 30°C と 80°C 付近に吸熱ピークが見られる。MSP1-MsbA では 25°C、55°C、90°C 付近に吸熱ピークが見られる。DMPC の転移温度は 23°C であることから判断すると MSP1-MsbA における 25°C 付近の吸熱は DMPC の転移によるものであり 90°C 付近の吸熱は空のナノディスクと比較すると MSP1 の変性によるものであることが分かる。よって MSP1-MsbA において観察される 55°C 付近のピークが MsbA の変性プロセスを示していることが分かる。全ての MsbA-ナノディスクについて、また AMPPNP 存在下および非存在下での変性温度を測定した値を次項に示す。

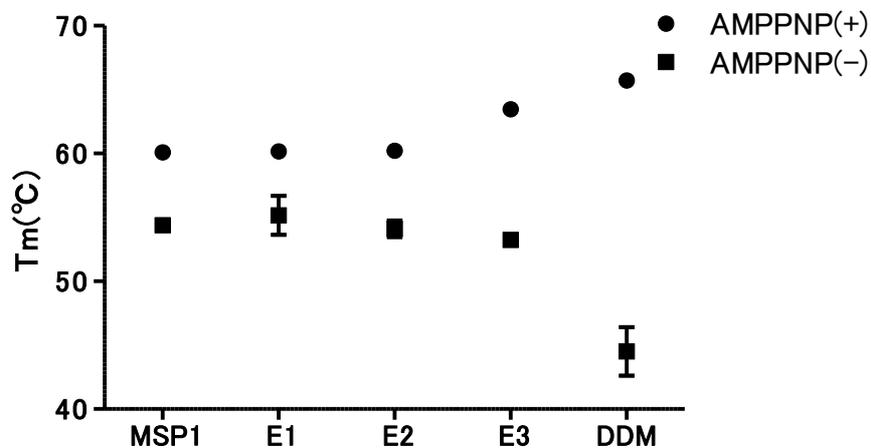


図 3-6 : MsbA-ナノディスクの変性温度

まず基質である AMPPNP 非存在下の■で示した値に着目すると図から分かる通り界面活性剤である DDM に可溶化された MsbA が最も熱安定性が低く他の MsbA-ナノディスクと比べると約 10°C 低かった。また、ナノディスク間で比べると DDM 程の差は見られなかったがサイズが小さい方が熱安定性は高い傾向にあった。次に AMPPNP 存在下の●を比較すると AMPPNP 非存在下の時とは逆の傾向が見られた。すなわち DDM において最も変性温度は高くなり、サイズの小さいナノディスクの方が熱安定性は低下していた。

※他の MSP の DSC 曲線は補足資料 S-7 を参照

3-3'. ATP 加水分解活性

以下に ATP 濃度が 2 mM の時の比活性を示す。

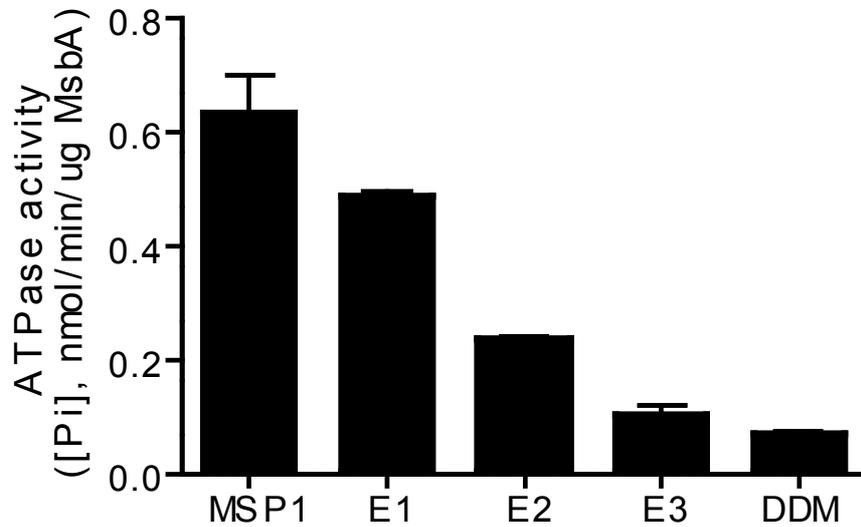


図 3-7: MsbA-ナノディスクの ATP 加水分解活性

図の通り DDM で可溶化されている MsbA が最も活性が低く、またサイズの小さい MSP1 など包摂された MsbA-ナノディスクの方が活性は大きかった。

次項に酵素速度論解析を行った場合の加水分解活性及びそこから得られた各速度論定数を示す。

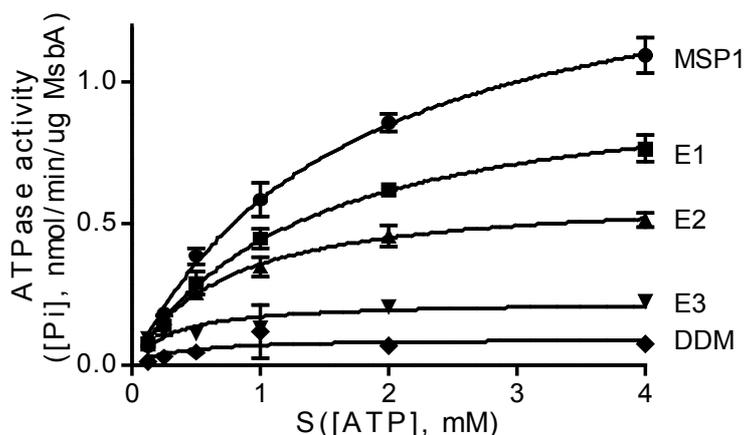


図 3-8: MsbA の酵素速度論解析

表 3-1: 各 MsbA の酵素速度論定数

	MSP1	E1	E2	E3	DDM
Vmax (nmol / min / μ g MsbA)	1.55	1.03	0.606	0.223	0.0942
k_{cat} (min ⁻¹)	100	66.0	39.1	14.4	6.08
K_M (mM)	1.67	1.34	0.708	0.317	0.375
k_{cat} / K_M	59.9	49.3	55.2	45.4	16.2

MSP1 などを用いたナノディスクのサイズが小さいほうが V_{max} 、 k_{cat} 、 K_M が大きいことが示された。しかしながら、酵素の触媒能を表す k_{cat} / K_M はあまりサイズの影響は受けなかった。これはサイズの小さいものでは V_{max} 、 k_{cat} が大きい、すなわち加水分解のサイクルは早かったが、 K_M は大きくなる、すなわちリガンドである ATP との結合は弱くなり結果として触媒能に差は見られなかったことを示している。

3-4'. ATP との相互作用測定

次項に MSP1-MsbA の ITC の滴定曲線及び全ての MsbA-ナノディスクについて算出された各熱力学定数を示す。

※DDM に関しては結合熱が殆ど見られなかったため有効なデータを得ることができなかった。また、転移温度より低い温度でも測定を行ったが有意なデータを得ることは出来なかった。

※他の MSP、20°C の滴定曲線及び熱力学定数は補足資料 S-8 を参照

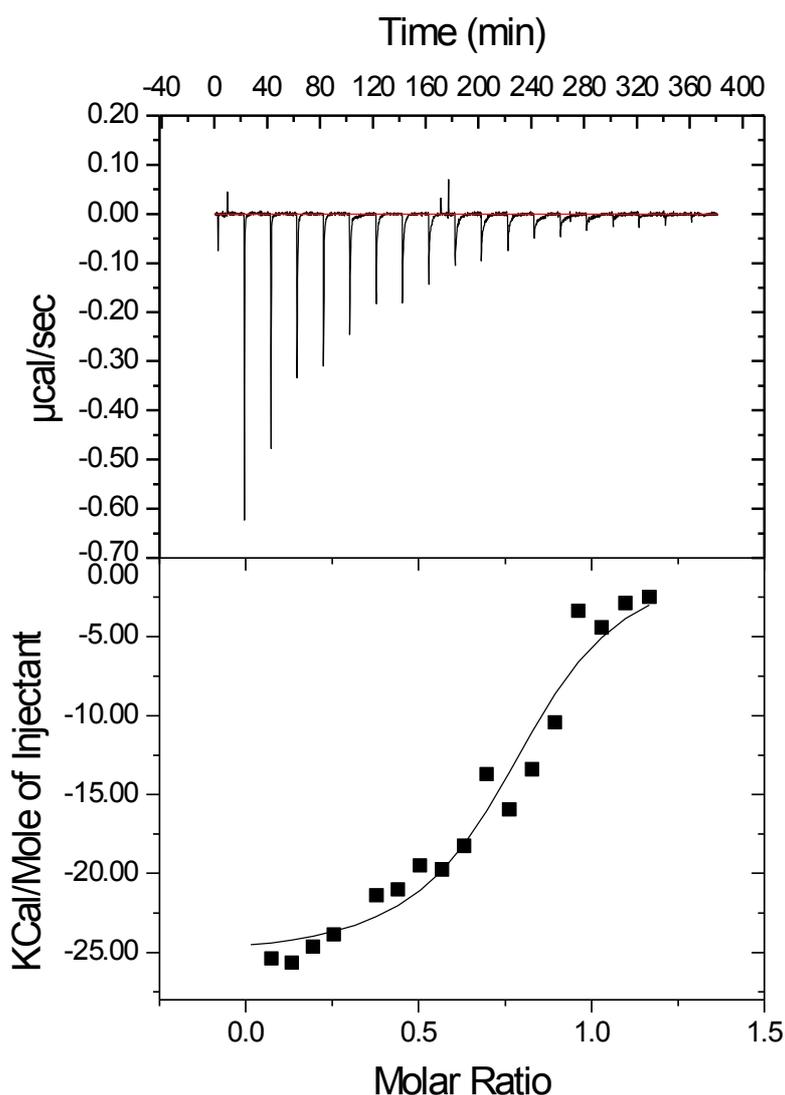


図 3-9 : MSP1-MsbA の ITC 滴定曲線

表 3-2 : MsbA-ナノディスクの熱力学定数

	MSP1	E1	E2	E3
$K_A(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	8.12	5.11	4.36	3.26
$\Delta G(\text{kcal / mol})$	-8.1	-7.8	-7.7	-7.6
$\Delta H(\text{kcal / mol})$	-25.4	-29.6	-35.8	-45.1
$-T \Delta S(\text{kcal / mol})$	17.3	21.8	28.1	37.5
N	0.794	0.508	0.452	0.257

K_A 、 ΔG はわずかに MSP1 などを用いたサイズの小さいナノディスクの方が絶対値が大きくなる傾向にあったがほとんど変化は見られなかった。 ΔH はサイズの大きいものの方が絶対値が大きくなった。これは AMPPNP との結合によ

って得られる熱量はサイズの大きいものの方が大きかった、すなわちサイズの大きいものの方が結合にともなってより安定化されたということを示している。 $-T\Delta S$ はサイズの小さいものの方が小さかった。これは結合に伴うエントロピーロスが小さかった、すなわち結合に伴う構造変化はサイズの小さい方が小さかったことを示している。また、結合比である N はサイズが大きくなるにつれて小さくなっている。

※他の MSP、DDM を用いた場合の滴定曲線は補足資料 S-9 を参照

3-5'. 膜の流動性の測定

以下に MSP1-MsbA の時の蛍光強度を示し、またそこから算出された各 MsbA-ナノディスクのアニソトロピー値を示す。

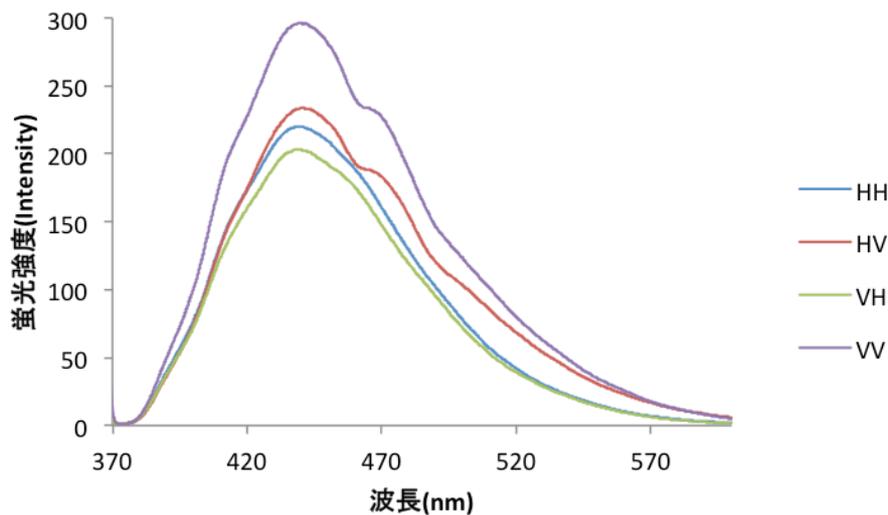


図 3-10 : MSP1-MsbA の蛍光強度

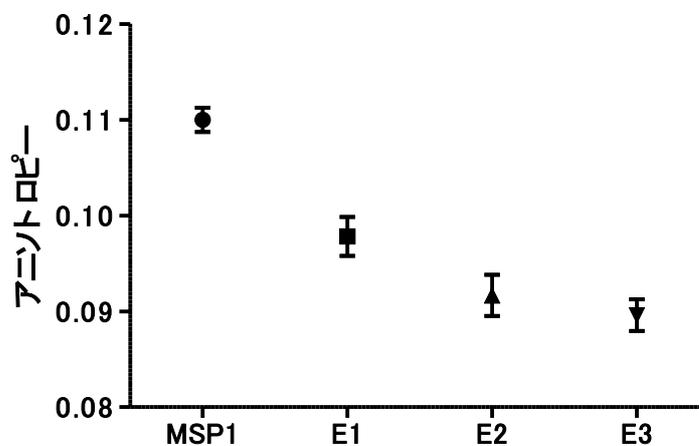


図 3-11 : MsbA-ナノディスクのアニソトロピー

サイズの大きいものの方がアニソトロピーは低下する傾向にあった。すなわち膜の流動性はサイズの大きいものの方が大きいということが示された。次項に ND Buffer + 10 mM MgCl₂ を用いた時のアニソトロピーを示す。

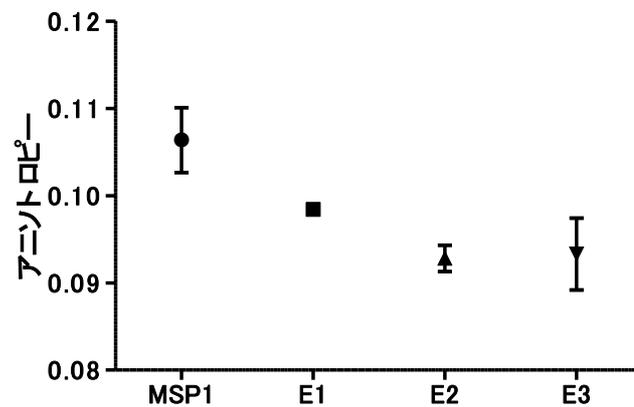


図 3-12 : Mg^{2+} 存在下でのアニトロピー

図から分かる通り Mg^{2+} 非存在下と比べ値に若干のばらつきはあるもののおおよそ変わらない結果が得られた。

※他の MSP-MsbA の蛍光スペクトルについては補足資料 S-10、S-11 を参照

3-6'. 異なる脂質を用いた解析

以下に DM(9:cis)PC を用いた場合と DMPC、MSP1 を用いた場合の ATP 加水分解活性及び酵素速度論定数を示す。

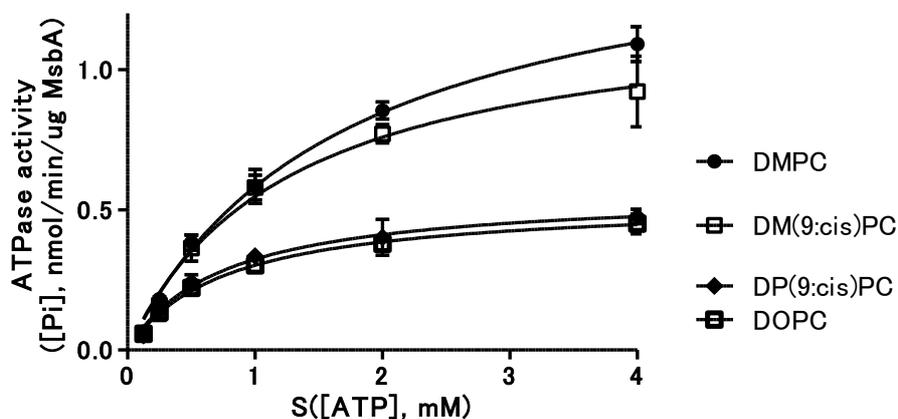


図 3-12: 異なる脂質を用いた酵素速度論解析

表 3-3. 異なる脂質を用いた場合の酵素速度論定数

	DMPC	DM(9:cis)PC	DP(9:cis)PC	DOPC
Vmax (nmol / min / μ g MsbA)	1.55	1.24	0.565	0.532
k_{cat} (min^{-1})	100	79.7	36.4	34.3
K_M (mM)	1.67	1.26	0.747	0.763
k_{cat} / K_M	59.6	63.2	48.8	45.0

DM(9:cis)PC を用いた場合にはサイズの大きいナノディスクと同様に k_{cat} 、 K_M ともに下がり触媒能である k_{cat} / K_M はあまり変わらなかった。それぞれの絶対値としては MSP1 と E1 の中間くらいの値をとった。DP(9:cis)PC、DOPC は同程度の値を取り、MSP1、DM(9:cis)PC と比較すると k_{cat} 、 K_M は共に小さくなりまた k_{cat} / K_M も若干低下した。

以下に DM(9:cis)PC を用いた場合と DMPC、MSP1 を用いた場合のアニトロピー値を示す。

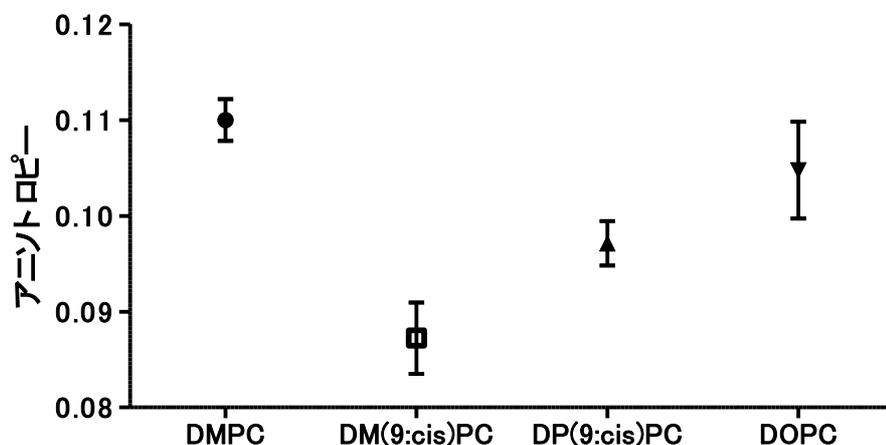


図 3-13：異なる脂質を用いた場合のアニトロピー

異なる脂質を用いた測定では全ての脂質においてアニトロピーはDMPCと比較して低下した、すなわち膜の流動性は増加したことが示された。DP(9:cis)PC、DOPC と炭素鎖が長くなるにつれてアニトロピーは増加した、すなわち膜の流動性は低下した。

※DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC の蛍光スペクトルについては補足資料 S-10、S-11 を参照

[考察]

均一化された MsbA-ナノディスクを用いて熱安定性を測定したところ基質である AMPPNP 非存在下では界面活性剤である DDM で可溶化された MsbA やサイズの大きいナノディスクに包摂された MsbA の方が熱安定性は低かった。しかしながら AMPPNP 存在下では逆にこれらの分子種では熱安定性は向上していた。これはこれらの分子種では AMPPNP 存在下では AMPPNP 非存在下で観察される熱的に不安定な構造へ遷移しにくくなったためその分構造が安定化されたのではないかと推察できる。

ATP 加水分解活性は DDM に比べて上昇していた。この値(MSP1 : $V_{max} = 1.55 \text{ nmol / min / } \mu\text{g MsbA}$)は過去の報告にある *E coli.* や Soy bean の脂質を用いたリポソームの値($0.037 - 1.48 \text{ nmol / min / } \mu\text{g MsbA}$)(26, 32)よりも大きいか同程度であったためナノディスクに包摂された MsbA は機能を保っていたと考えられる。また、ナノディスク間で比較したところ k_{cat} 、 K_M ともにサイズの小さいナノディスクの方が大きくなった。一方で、酵素の触媒能を示す k_{cat} / K_M はあまり変化しなかった。 k_{cat} が大きくなったことは加水分解の速度が大きくなったことを示しており、 K_M が大きくなったことはリガンドである ATP との親和性が低下したことを示している。これらの結果はナノディスクの大きさが膜蛋白質の構造や構造間の遷移定数(速度、平衡)に影響を与え、その結果生化学的活性にも影響を与えると仮定すると、以下のように説明することができる。MsbA のホモログである *Lactobacillus brevis* 由来の ABC トランスポーターの HorA は脂質の性質を変えるとその構造と ATP 加水分解活性を変化させるという報告がなされている(45)。HorA は phosphatidylethanolamine(PE)を用いたリポソームでは膜貫通領域の開き具合が大きくなり ATP 加水分解活性は小さくなった。また、重水素交換を利用した全反射フーリエ変換赤外分光器による実験から構造のゆらぎは PE を用いた方が大きくなり構造安定性は低下していた。今回の結果とこの報告を合わせて考えるとサイズの小さいナノディスクでは次項の図 3-14 のように膜貫通領域の開きの角度が小さくなり膜貫通領域の加水分解に伴う構造変化が小さくなったため k_{cat} 、すなわち加水分解の速度が大きくなったと推察することが出来る。また、 K_M 、すなわち ATP との親和性が低下したのは膜貫通領域の開きの角度が小さくなったことにより結合サイトにアクセスしづらくなったことが考えられる。また、熱安定性解析の結果と合わせるとサイズの小さいナノディスクではサイズの大きいナノディスクと比べてリ

ガンドとの結合によって獲得できるエネルギーが小さくなったため ATP との親和性が低下したと考えられる。また、MsbA は ATP を加水分解した後 ADP が解離してから膜貫通領域を開くので ADP の解離による影響は少なくなると考えられる。

上記の ATP との相互作用を詳細に理解するために ATP の非加水分解性アナログである AMPPNP を用いて等温滴定型熱量測定を行った。等温滴定型熱量測定では結合定数である K_A

及び ΔG はほぼ一定値を保っていた。しかしながら ΔH の絶対値はサイズの小さいナノディスクの方が小さい、すなわち結合によって得られる熱エネルギーはサイズの小さいナノディスクの方が小さかったという結果が得られた。また、 $-T\Delta S$ の項を比較するとサイズの小さいナノディスクの方が小さい、すなわち結合に伴う構造変化はサイズの小さいナノディスクの方が小さくなるという結果が得られ、熱安定性解析や酵素速度論解析と合致する結果を得ることが出来た。結合比はナノディスクのサイズが大きくなるにつれて小さくなっておりこの結合比が小さくなったことは AMPPNP と結合することの出来る活性を持つ分子が失活などによって少なくなったことや、また、AMPPNP と結合する構造を取ることの出来ない状態に平衡が大きく傾いていることなどが考えられるが詳細な理解にはクロスリンクを用いた分子内架橋から分子の状態を見積もるなどといった解析が必要になるだろう。また、この結合比が低下してことにより k_{cat} などの速度定数が小さくなったことが考えられるが次項の表のように結合比で k_{cat} を補正してもサイズによる傾向は変わらなかったため活性の違いは結合比の違いだけでは説明することはできない。

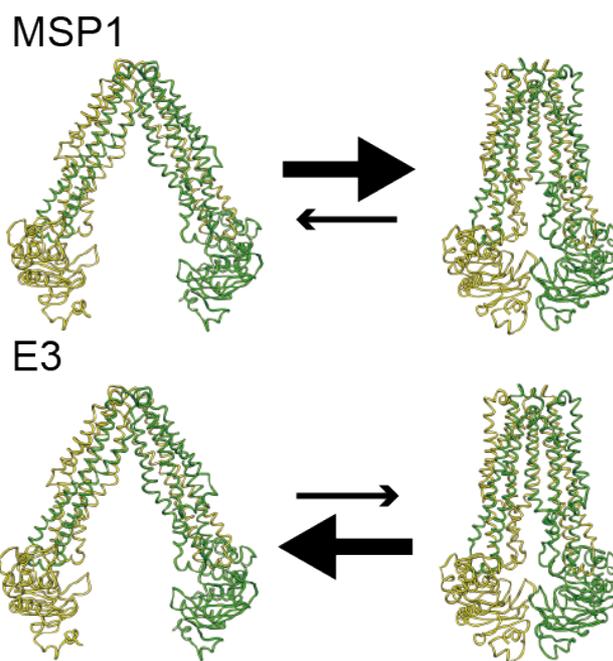


図 3-14 : MSP1 と E3 の構造の予測

表 3-4 : k_{cat} の補正

	MSP1	E1	E2	E3
k_{cat}	100	66.1	39.1	14.4
N	0.794	0.508	0.452	0.257
k_{cat} / N	126	130	86.4	55.9

膜蛋白質と膜との相互作用は主に三つの要素の影響を受ける(46-48)。一つ目は脂質膜の頭部の親水基との相互作用、二つ目は膜全体の曲率、三つ目は膜の流動性である。この実験で用いた脂質は同じであるので脂質の頭部との相互作用の影響は無視できる。膜全体の曲率であるがこれは主に脂質の疎水部の構造の違いに起因する場合が多いのでこの要素も影響している可能性は低いと考えられる。よって残る膜の流動性を測定することとした。膜の流動性をアニトロピー測定により測定したところサイズの小さいナノディスクの方がアニトロピー値は大きいすなわち膜の流動性は低いという結果が得られた。つまり、これまでの結果は膜の流動性の違いに起因するということが示された。

結晶構造より MsbA は膜貫通領域を広げるには最大で約 7 nm の長さが必要であるが一番小さいナノディスクでも 10 nm 以上の大きさなので十分な大きさがあると考えられる。これはサイズの小さいナノディスクで MsbA は膜貫通領域を大きく開くことが出来なくなっているのではなく角度が小さい方に平衡が偏っていると考えられる。このことと前述した結果から MsbA は図 3-14 のように小さいナノディスクに包摂されると膜の流動性が下がったことにより膜貫通領域の動きが制限され ATP との結合に伴う構造変化は小さくなる。そのためサイズの大きなナノディスクに比べて余分な動きが少なくなり加水分解の速度が大きくなったと考えられる。サイズの大きいナノディスクに包摂されると膜の流動性は上がり膜貫通領域の動きも大きくなり ATP との結合に伴う構造変化も大きくなる。また、膜貫通領域の動きが大きくなるとそれだけ蛋白質内の疎水性残基が溶媒に露出しやすくなり安定性は低下するため結合によって獲得できるエネルギーは大きくなったと考えることが出来る。

異なる脂質を用いた実験では炭素鎖が長くなるにつれてアニトロピー値は上昇、すなわち膜の流動性は低下したが今までの結果とは逆に K_M 、 k_{cat} は減少した。これは膜の流動性の他に脂質の疎水部も変化しているため膜全体の曲率が変わり、その影響が反映されたからではないかと考えられる。脂質膜は疎水部の長さが短くなると図 3-15 のように膜蛋白質に圧力を掛けるようになる。こ

の圧力により DM(9:cis)PC における MsbA は膜貫通領域の開く角度が小さくなり膜の流動性の上昇分に対して活性低下は抑えられたのではないかと考えられる。DP(9:cis)PC では DM(9:cis)PC と比較して流動性は低下して本来なら活性も上昇するはずであるが疎水部も長くなったので MsbA にかかる圧力も小さくなり活性は低下したと考えられる。また、DOPC では流動性の低下による活性上昇と疎水部が長くなったことによる圧力低下が同程度となったため DM(9:cis)PC と同程度の活性を示したと考えられる。

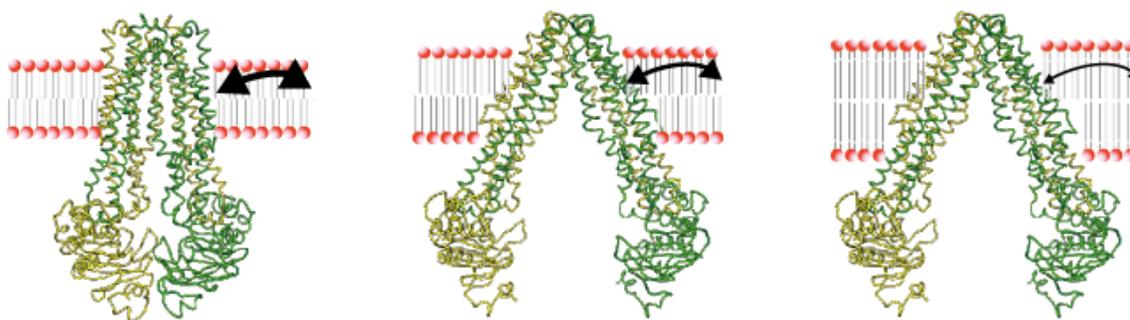


図 3-15：疎水部の違いによる圧力

アニソトロピー測定において MSP1 と E3 におけるアニソトロピー値の差は約 0.02 となりこれは過去の報告におけるナノディスクと Large Unilamellar Vesicle(LUV)との差に匹敵するほどの大きな値であった(49)。LUV は直径が数百 nm 程でありナノディスクは直径が 10 nm 程度であるのに対して本実験で使用した MSP1 と E3 はわずかに 1 nm しか大きさに違いがないのにアニソトロピー値には大きな違いが見られた。リポソームにおいて膜の流動性を変えるには通常コレステロールなどの膜成分を新たに加える必要があるが膜組成を変えると 3-6 で示したように曲率とそれに伴う膜蛋白質への圧力まで変わる可能性がある。ナノディスクでは膜成分は変えずに使用する MSP を変え大きさを変えることのみで流動性を変えることができる。そのためナノディスクでは従来法とは異なり脂質と膜蛋白質との相互作用を明確に記述することが可能となるだろう。

本章においてナノディスクはその大きさにより流動性を変化させ、その結果膜蛋白質の安定性や活性、構造変化に大きな影響を与えることが示された。これはナノディスクを用いれば膜蛋白質の生化学的及び物理化学的性質の定量的評価を行うことが出来るのみではなく脂質と膜蛋白質との相互作用及びそこから誘起される構造変化などの機能解析に適していると考えられる。

第四章

MsbA-ナノディスクの応用的利用法

[略称]

SPR : Surface Plasmon Resonance

SA : ストレプトアビジン

DMPC : 1, 2 - dimyristoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DMPG : 1, 2 - dimyristoyl - *sn* - glycerol - 3 - phospho - (1' - rac - glycerol)

DOPC : 1,2 - dioleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DLPC : 1, 2 - dilauroyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DM(9:cis)PC : 1, 2 - dimyristoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

DM(9:trans)PC : 1, 2 - dimyristelaidoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

ATP- γ -S : Adenosine 5'- γ -thiotriphosphoric acid

IMAC : 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー

1B : 図 4-4 に示した 1 の位置にビオチン化オリゴヌクレオチドを使用したもの

138B : 図 4-4 に示した 1, 3, 8 の位置にビオチン化オリゴヌクレオチドを使用したもの

[概要]

4-1. MsbA-ナノディスクの応用的利用法

膜蛋白質は第一章の序論で述べたとおり現在の医薬品の半分以上のターゲットとなっている。医薬品の探索においてターゲットとなる蛋白質への表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた小分子スクリーニングは非常に有効である(50-51)。SPR を用いて膜蛋白質を解析する際に従来はセンサーチップ上に人工的な脂質二重膜を構築する手法が用いられていたが、この方法では測定中やセンサーチップの再生を行う際に酸変性などによって脂質膜が壊れ、膜蛋白質の機能が損なわれてしまうおそれがあるなど安定性に問題があった。ナノディスクは化学的に安定であるのでナノディスクを用いれば膜を破壊することなくセンサーチップの再生を行うことが出来るのではないかと期待される(52)。本章ではその第一歩としてナノディスクに包摂された MsbA が SPR において ATP への結合活性を保つかどうか、また、SPR における汎用性を確認するために様々な脂質組成で解析を行う。

また、膜蛋白質は膜上での様々な反応を担っているがその中には細胞接着などに代表されるように多種多様な膜蛋白質の総和で反応が進む場合がある(53-54)。このような反応においては膜蛋白質の空間配置を自由に設計できるような鋳型が必要であるが従来はそのような技術に乏しかった。そこで近年開発された DNA origami という技術に着目した。DNA origami とは M13mp18 のファージベクターである大環状一本鎖 DNA が staple 鎖と呼ばれる短い DNA 鎖で折りたたまれた DNA 構造体のことでこの staple 鎖の配列を工夫することで様々な形状を構築することが出来る(55)。また、この staple 鎖にビオチンなどの小分子による修飾を施すことで DNA origami 上の任意の位置に任意の分子を結合させることが可能である(56-60)。そのため、膜蛋白質を包摂したナノディスクを DNA origami 上の任意の位置に配置させることができれば将来的に多種多様な膜蛋白質群の反応を再現し解析を行うことが可能になると期待される。

本章ではその第一段階として MsbA-ナノディスクが DNA origami 上の任意の位置に固定することが出来るかどうか、また、DNA origami 上で固定化された MsbA が活性を持つかどうか解析を行う。具体的には MSP1 にビオチン化可能な Avi タグ、また蛍光色素標識を行うためシステイン残基を導入し MSP1 のビオチン化、蛍光色素標識を行う。次いでストレプトアビジン(SA)を介して DNA origami への固定化を行い ATP 加水分解活性を測定する。

[方法]

4-2. SPR による蛋白質の相互作用測定の原理

表面プラズモン共鳴法とは、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用して分子間の相互作用をセンサーチップ上に再現することで二分子間の相互作用の結合定数や結合速度を測定する手法である(61-62)。この相互作用は特定の角度の入射光と表面プラズモンが金属/液体界面で起こす共鳴現象を利用し、二分子間の結合解離に伴ってセンサーチップ表面上で生じる微量な質量変化を SPR シグナルとして検出することによって得ることが出来る。図 4-1 のように分子の固定化されていない反対側に光を全反射するように当てると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分 (SPR シグナル) が観察される。この SPR シグナルの現れる角度は、センサーチップ表面近傍の屈折率に依存し、この屈折率変化は質量変化に比例する。例えばセンサーチップ表面で二分子間の結合反応が起きると質量変化が生じ、光の暗い部分が I から II に移動する。逆に、二分子が解離することによって質量が減少すると、II→I にその分だけ戻る。この I から II にシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データ (センサーグラム) としてプロットする。このセンサーグラムのカーブから結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) を、2 つの定数の比から結合定数 ($KD = k_d / k_a$) を求めることができる。

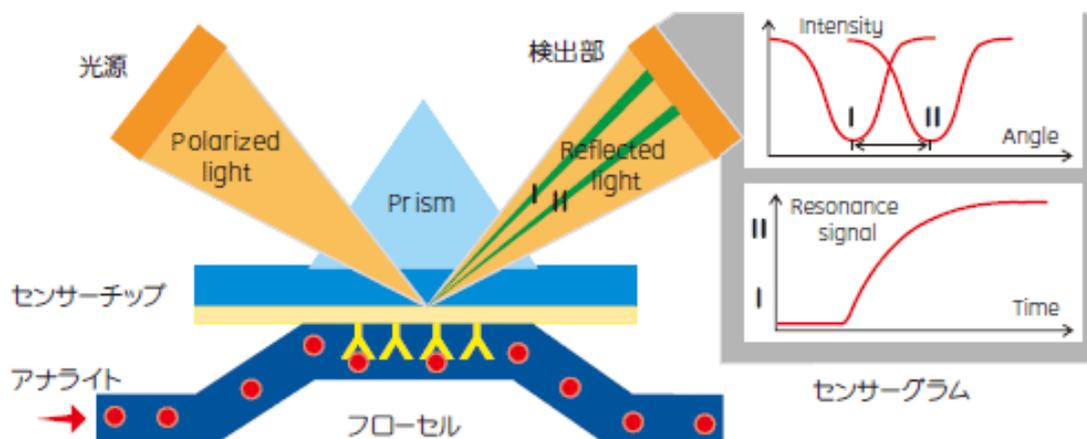


図 4-1 : SPR による蛋白質の相互作用測定※

※図は GE ヘルスケア、

http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/biamic_pri.html

より抜粋

4-3. 様々な脂質による MsbA の包摂

SPR における汎用性を確かめるために MSP1、E3 を用いて様々な脂質組成のナノディスクで MsbA を包摂した。包摂の手順は第二章で述べたとおりであるが本章では Bio-Beads SM2 を加えた後にサイズ排除クロマトグラフィーを行いその後に IMAC による Ni カラム精製を行った。脂質には DMPC、1, 2 - dimyristoyl - sn - glycerol - 3 - phospho - (1' - rac - glycerol)(DMPG)、DOPC、1, 2 - dilauroyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine(DLPC)、DM(9:cis)PC、1, 2 - dimyristelaidoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine(DM(9:trans)PC)を使用した(各脂質の構造は補足資料 S-1 を参照)。

4-4. ATP- γ -S との結合解析

4-3. によって得られた 2 つの大きさ、様々な脂質組成の MSP-MsbA と ATP の非加水分解性アナログである ATP- γ -S との結合を SPR によって解析した(GE ヘルスケア、Biacore T200)。測定にはまず図 4-2 のように Anti-His 抗体をセンサーチップ上に固定化しその上にリガンドとして MSP-MsbA をキャプチャーさせた。アナライトとして濃度の変えた ATP- γ -S を流し結合の解析を行った(Running Buffer : 50 mM Tris / HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.4)。

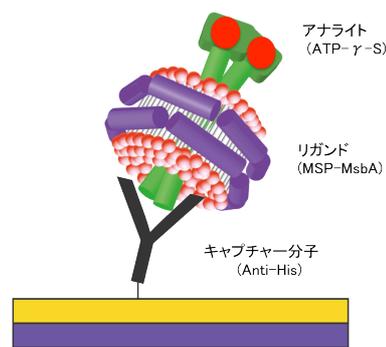


図 4-2 : SPR のイメージ図

4-5. MSP1 への Avi タグ、システインの導入

MSP1 のベクターに Avi タグ、及びシステインの導入を行う。Avi タグとは GLNDIFEAQKIEWHE の 15 残基からなるアミノ酸配列のことでこの配列を特異的に認識するビオチン化酵素 BirA によってリシン残基がビオチン化される(63)。また、システインは反応性の高いアミノ酸側鎖でありマレイミド基などを用いて蛍光標識することが出来る。

MSP1 の配列に TOYOBO 社の Mutagenesis Kit を使用した部位特異的変異導入で塩基挿入を行い Avi タグの導入を行った。また、そこからさらに部位特異的変異導入で塩基挿入を行うことによりシステイン残基の挿入を行った。

※以降このようにして構築された遺伝子及び発現される蛋白質をMSP1AviCと記載する。

4-6. MSP1AviC の発現、精製

MSP1AviC の発現及び精製は第二章におけるMSP1と同様に行った。ただし、MSP1AviCにはシステインが存在するためメルカプトエタノール存在下で実験を行い保存時には1 mM DTTとなるようにした。

4-7. BirA の発現、精製

ビオチン化酵素である BirA の精製を以下のように行った。ベクターには pET32a を使用した。大腸菌 BL21(DE3) を使用して LB プレート培地(アンピシリン(Amp) : 100 μ g/ml) に形質転換をした。28 $^{\circ}$ C、LB 培地で培養して O.D.₆₀₀ ~ 0.6 で IPTG を終濃度 1mM になるように加えた。28 $^{\circ}$ C のまま約 22 時間培養した後 7000 \times g、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心をして集菌した。25 mM Tris / HCl、200 mM NaCl、pH 8.0(BirA Buffer) で菌体を懸濁し菌体を超音波破碎した。20,000 \times g、30 分、4 $^{\circ}$ C で遠心をして上清を回収し金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) で精製を行った(クロマトグラフィーシステム : GE ヘルスケア、AKTA システム:*以下クロマトグラフィーには特に記載のない場合この装置を使用した。使用カラム : His Trap HP 5 ml)。IMAC での精製法の概略を次項に示す。

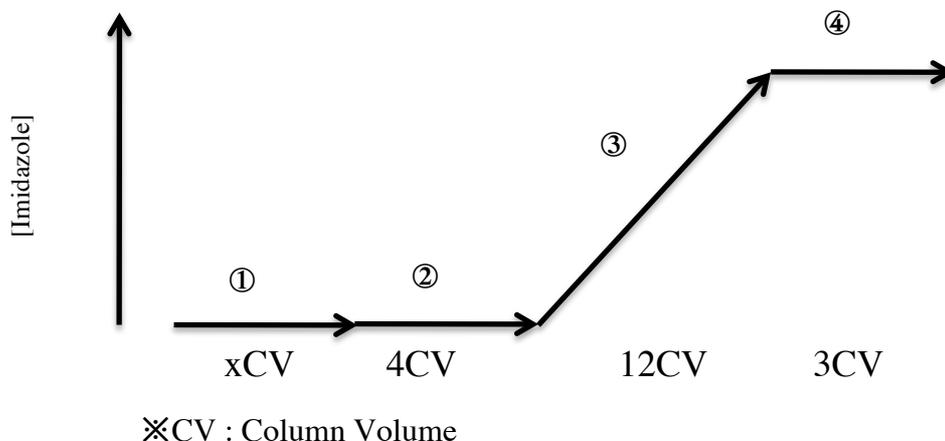


図 4-3 : IMAC の精製

- ① : サンプル
- ② : BirA Buffer
- ③ : ② + ④ (Gradient)
- ④ : BirA Buffer + 300 mM Imidazole

次に、この③の溶出画分のうち純度の高いものを回収し BirA : TEV プロテアーゼ = 30 : 1 になるように TEV プロテアーゼを加え約 12 時間室温で BirA Buffer に対して透析しながら HisTag を切断した。再度 IMAC により最終精製を行った (使用カラム : GE ヘルスケア、His Trap HP 5ml)。TEV プロテアーゼには HisTag がついており切断したサンプルには切断された BirA、未切断の BirA、TEV プロテアーゼ、比較的カラムに吸着しやすい夾雑物が含まれるのでもう一度 IMAC を行うと目的の切断された BirA のみが Flow Through に溶出される。精製された BirA にグリセロールを加え 50%グリセロールとして 1 mg / ml となるようにして -80℃で保存した。

4-8. MSP1AviC の Cy3 化、ビオチン化

MSP1AviC のビオチン化を以下のように行った。4-6 で精製された MSP1AviC を GE ヘルスケア社の NAP-5 カラムを用いて DTT の除去を行った。その後約 80 μ M とし Cy3 マレイミドを MSP1AviC : Cy3 マレイミド = 1 : 10 となるように加え 4℃で 8 時間混合した。その後 BirA : MSP1AviC = 1 : 25 となるように加え、

0.5 M bicine buffer, pH 8.3

100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 500 μ M d-biotin

を MSP1AviC に対して体積比で 8 : 1 : 1 となるように加え室温で四時間混合した。その後サイズ排除クロマトグラフィーによって余剰の Cy3 マレイミドと BirA その他の夾雑物を取り除いた。(使用カラム : HiLoad 16/600 Superdex 200 pg、Running Buffer : Buffer A + 5 mM sodium cholate)また、MSP1AviC はストレプトアビジンと混合すると複合体を作り SDS-PAGE 上でのバンド位置がシフトするのでそのバンドシフトからビオチンの標識率を見積もった。

4-9. MSP1AviC を用いた MsbA の包摂

MSP1AviC を用いた MsbA の包摂は第二章における他の MSP と同様にして行った。また、脂質には頭部に負電荷を持つ DMPG を用いた。MsbA の存在比は第二章と同様に SDS-PAGE における濃度既知の MSP1AviC と MsbA のバンド比から決定した。

4-10. MSP1AviC-MsbA の DNA origami への固定化

MSP1AviC-MsbA のナノディスクへの固定化は以下のようにして行われた。まず DNA origami を形成するために M13mp18(250 ng / μ l) 120 μ l、staple 鎖 (216 nM)(次項の図 4-4 に示した 1 の位置(1B)、または 1, 3, 8 の位置にビオチン化オリゴヌクレオチド(138B)、12 の位置に Cy5 が結合している。また、staple 鎖の配列は引用文献 58 を参照)150 μ l、200 mM Tris / HCl, 100 mM Mg(OAc)₂, 10 mM EDTA を 30 μ l 加えた。その溶液を 85°C から毎分 2°C ずつ 25°C まで温度を下げ DNA origami を作製した。その後 PALL 社の NANOSEP 300k OMEGA を使用して 60 μ l まで濃縮した。DNA origami : ストレプトアビジン (SA) = 1 : 10(138B の位置にビオチンがあるものについては 1 : 30)となるように SA を加え 15 分間室温で混合した。余剰の SA を GE ヘルスケア社の Sephacryl S-400HR を 1.6 ml 用いて除去した。その後 DNA origami : MSP1AviC-MsbA = 1 : 5(138B の位置にビオチンがあるものについては 1 : 15)となるように加え室温で 15 分混合した。その後 Sephacryl S-400HR を 800 μ l 用いて過剰の MSP1AviC-MsbA を除き精製を行った。DNA origami の濃度は 260 nm の吸光度より、最終的な MSP1AviC-MsbA と DNA origami の存在比は以下のように

決定した。MSP1AviC には Cy3 が DNA origami には Cy5 が結合しているためコントロールとして濃度既知の MSP1AviC を用いたナノディスクと DNA origami の 0.7%アガロースゲル上のバンド比から算出した。

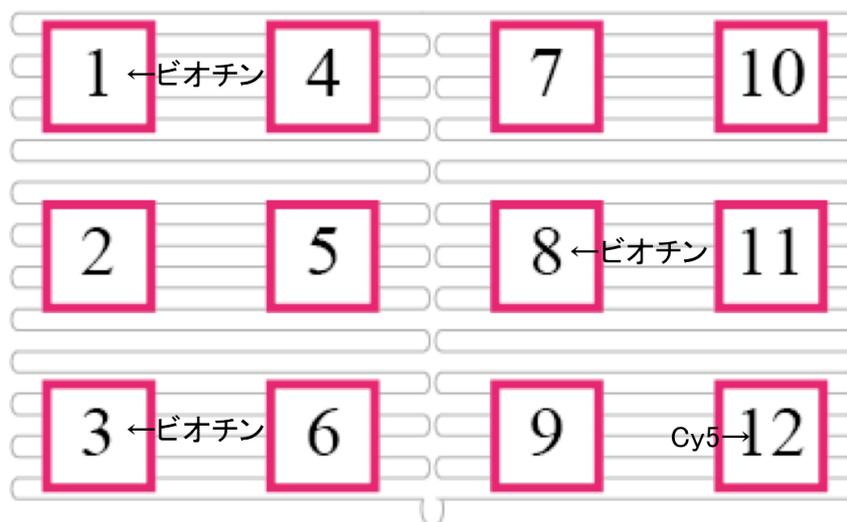


図 4-4 : DNA Origami 上のビオチン、Cy5 の位置

4-11. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の観察

MSP1AviC-MsbA-DNA origami を原子間力顕微鏡を用いて観察を行った。

使用装置：生体分子計測研究所、NanoExplorer

測定モード：タッピングモード

カンチレバー：オリンパス、AC10DS-A2, AC10FS-A2

基板：Mica

4-12. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の酵素活性測定

DNA origami 状に固定化された MSP1AviC-MsbA の酵素活性は NADH の酸化とのカップリングによる NADH の吸光度の減少を利用して測定した(64)。

50 mM HEPES / NaOH, pH7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, x mM ATP

(ATP は 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mM とした)

に対して 10 mg / ml pyruvate kinase 0.6 μ l、10 mg / ml Lactate dehydrogenase 1.2 μ l、20.6 mg / ml phosphoenol pyruvate 6 μ l、NADH 0.6 μ l、MSP1AviC-MsbA-DNA origami を終濃度約 5 nM となるように加え全量

を $120\ \mu\text{l}$ として 37°C で 25 分間 $340\ \text{nm}$ の吸光度を測定し 1B 及び 138B の ATP 加水分解活性を決定した。また、DNA origami に固定化されていない MSP1AviC-MsbA の酵素活性も同様に測定した。基質である ATP 濃度を変化させて酵素速度論解析を行いミカエリス・メンテン式より V_{max} 、 k_{cat} 、 K_{M} 、 $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ を算出した。

[結果]

4-3'. 様々な脂質による MsbA の包摂

以下に MSP1、E3 を使用した時のサイズ排除クロマトグラフィーにおけるクロマトグラムを示す。

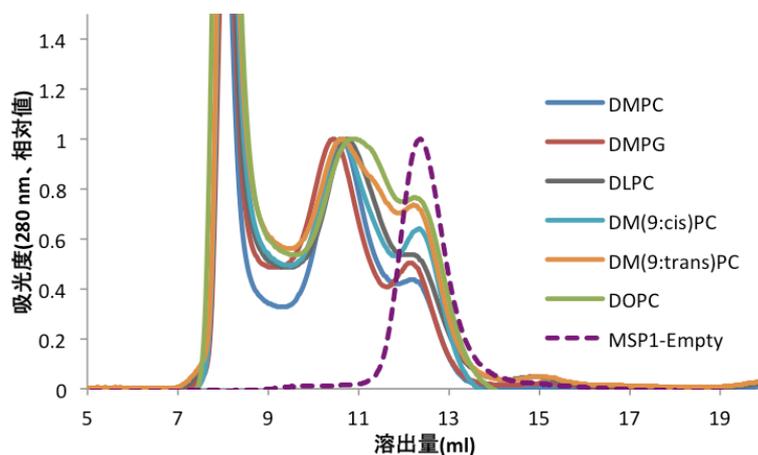


図 4-5：MSP1 を使用した時のクロマトグラム

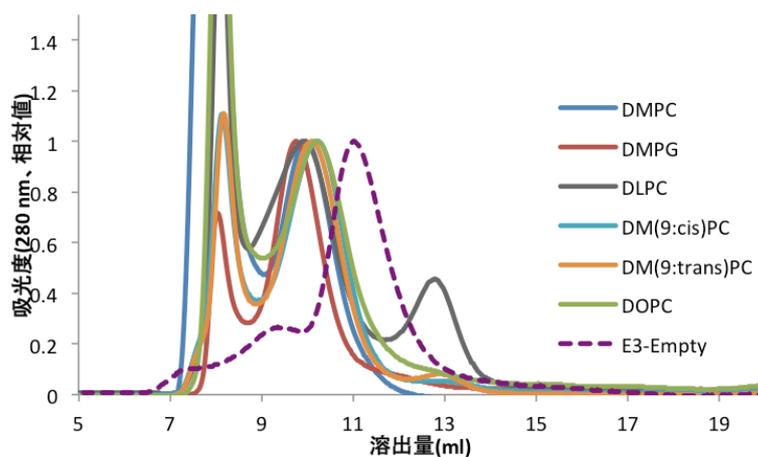


図 4-6：E3 を使用した時のクロマトグラム

凝集や正しいサイズよりも小さいものはあったものの全ての脂質において MSP1、E3 ともに空のナノディスクよりもピークシフトが観察されたことから全ての脂質で MsbA の包摂を確認した。

4-4'. ATP- γ -S との結合解析

まず MSP1-MsbA-DMPC の Anti-His 抗体によるナノディスクのキャプチャーのセンサグラムを以下に示す。

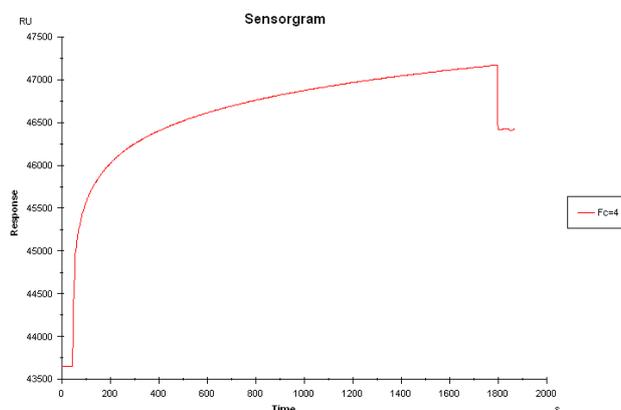


図 4-7 : MSP1-MsbA-DMPC のキャプチャー

このように 2763.2RU MSP1-MsbA-DMPC はキャプチャーされた。次に ATP- γ -S を流した時のセンサグラムを以下に示す。

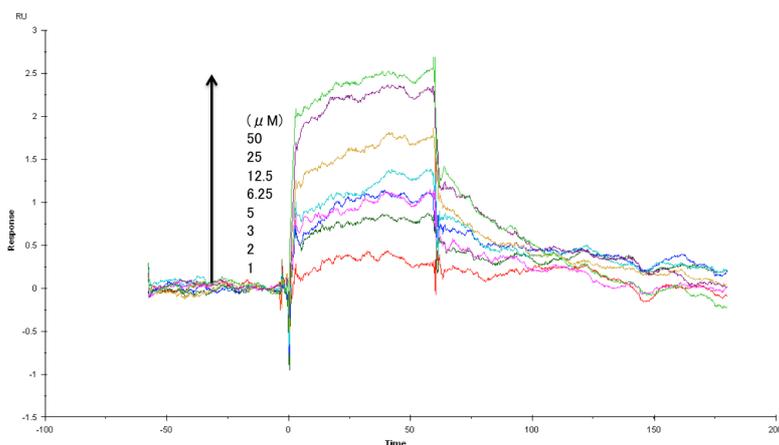


図 4-8 : MSP1-MsbA-DMPC と ATP- γ -S の結合のセンサグラム

このセンサグラムより得られたスキッチャードプロットを以下に示す。

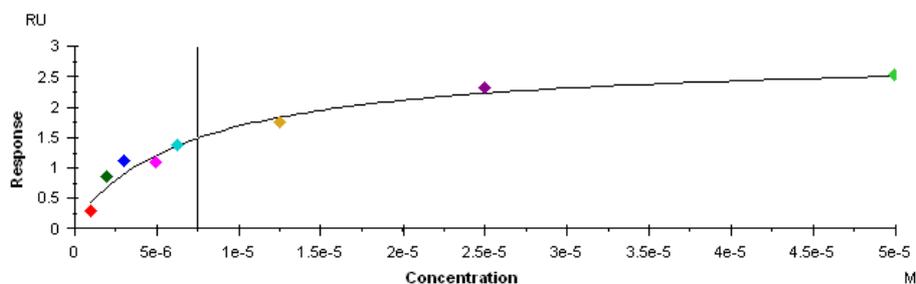


図 4-9 : MSP1-MsbA-DMPC と ATP- γ -S のスキッチャードプロット

このプロットより得られた K_D 値及び他のパラメータは以下の表の通りである。

表 4-1: 各成分の K_D 値

	DMPC	DMPG	DOPC	DLPC	DM(9:cis)PC	DM(9:trans)PC
MSP1(10^{-6} M)	7.47	2.94	4.48	2.92	3.82	0.0330
E3(10^{-6} M)	0.0486	0.698	0.511	0.0416	0.0247	0.0763

この表の通り MSP1 に関しては DM(9:trans)PC 以外の K_D 値は約 10^{-6} M 程度であった。DM(9:trans)PC については 10^{-8} M 程度であった。E3 に関しては DMPG、DOPC に関しては 10^{-7} M 程度、その他の脂質については 10^{-8} M 程度であった。

※他の MsbA-ナノディスクに関するキャプチャー及びスキッチャードプロットは S-12 を参照

4-5'. MSP1 への Avi タグ、システインの導入

以下に MSP1AviC の配列を示す。

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGGLNDIFEAKIEWHE^CCLKLLDNWD
 SVTSTFSKLREQLG^PVTQEFWDNLEKETEG^LRQEMSKDLEEVKAKVQP
 YLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSP^LGEE
 MRDRARAHVDALRTHLAPYSDEL^RQLAARLEALKENGGARLA^EYHAK
 ATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

配列の青色で示された部分が挿入された Avi タグの配列である。また赤色で示したシステインの導入にも成功した。

4-6'. MSP1AviC の発現、精製

以下に一回目の IMAC 精製後及び TEV の SDS-PAGE を示す。

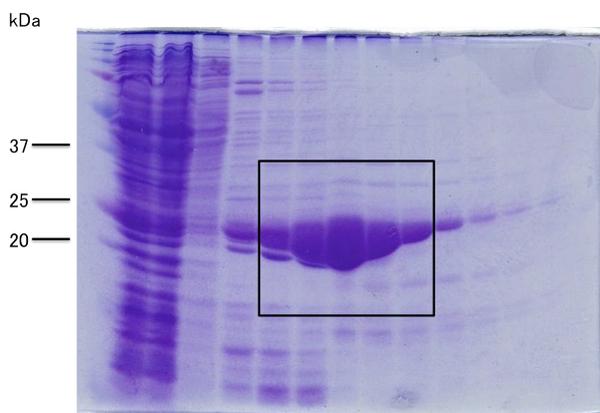


図 4-10 : IMAC 後の MSP1AviC の SDS-PAGE

各レーンは左からマーカ、精製前、Flow through、Wash、以降右側が Elution である。図の黒枠で示したフラクションを TEV によって切断した。以下に TEV プロテアーゼによる His タグ切断後の SDS-PAGE を示す。

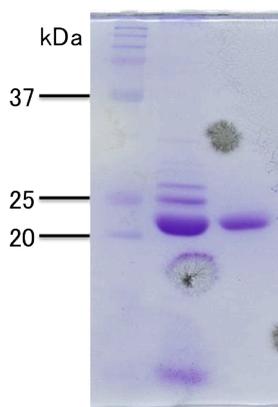


図 4-11 : TEV プロテアーゼによる切断後の MSP1AviC の SDS-PAGE

SDS-PAGE より MSP1AviC の TEV プロテアーゼによる His タグの切断及び精製に成功したことがわかる。

4-7'. BirA の発現、精製

以下に一回目の IMAC 後の精製後の SDS-PAGE を示す。

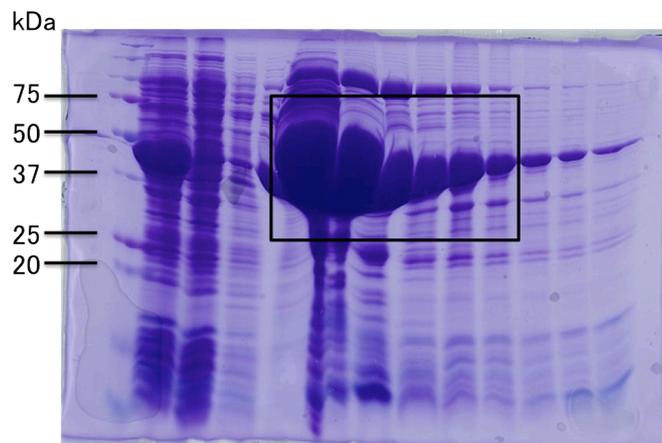


図 4-12 : IMAC 後の BirA の SDS-PAGE

各レーンは左からマーカー、精製前、Flow through、Wash、以降右側が Elution である。BirA には可溶化タグである Trx 蛋白質が TEV プロテアーゼの切断配列を挟んで存在しているため分子量は約 54kDa となる。マーカーと比べて若干低分子量側にバンドが見られるが確かに BirA は大量に発現されたことがわかる。図の黒枠で示したフラクションを TEV によって切断した。以下に TEV プロテアーゼによる His タグ切断後の SDS-PAGE を示す。

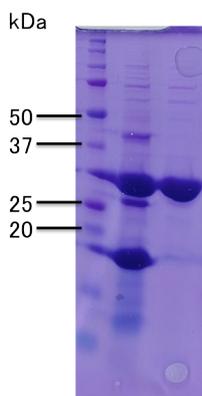


図 4-13 : TEV プロテアーゼによる切断後の BirA の SDS-PAGE

SDS-PAGE より BirA の TEV プロテアーゼによる His タグの切断及び精製に成功したことがわかる。

4-8'. MSP1AviC の Cy3 化、ビオチン化

以下にラベル後のサイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。

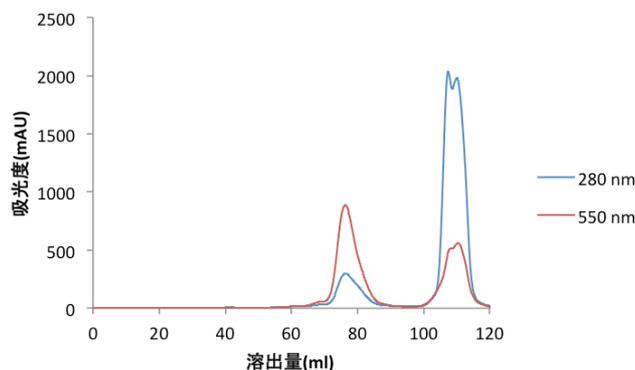


図 4-14 : Cy3 化、ビオチン化後のサイズ排除クロマトグラフィー

550 nm の Cy3 の吸光が観察されたので Cy3 は標識されたことが確認された。次項に SA を加えた時の SDS-PAGE 及びバンドシフトから算出されたビオチンの標識率を示す。

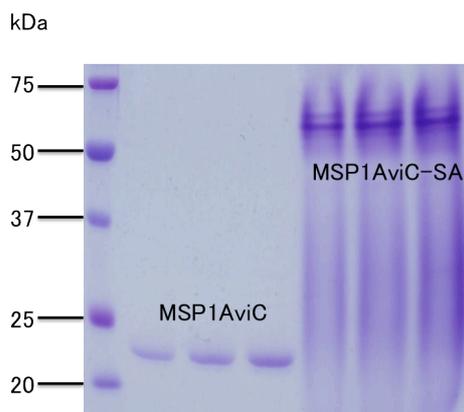


図 4-15 : MSP1AviC のビオチン化の標識率の確認

この MSP1AviC のレーンの MSP1AviC のバンド強度から MSP1AviC-SA のレーンの同じ位置のバンド強度を引くことで標識率を見積もることが出来る。標識率は $98.6 \pm 0.012\%$ となりほぼ全ての MSP1AviC がビオチン化されたことが確認された。

4-9'. MSP1AviC を用いた MsbA の包摂

前項で Cy3 化、ビオチン化された MSP1AviC を用いた MsbA の包摂におけるサイズ排除クロマトグラフィーの結果を以下に示す。

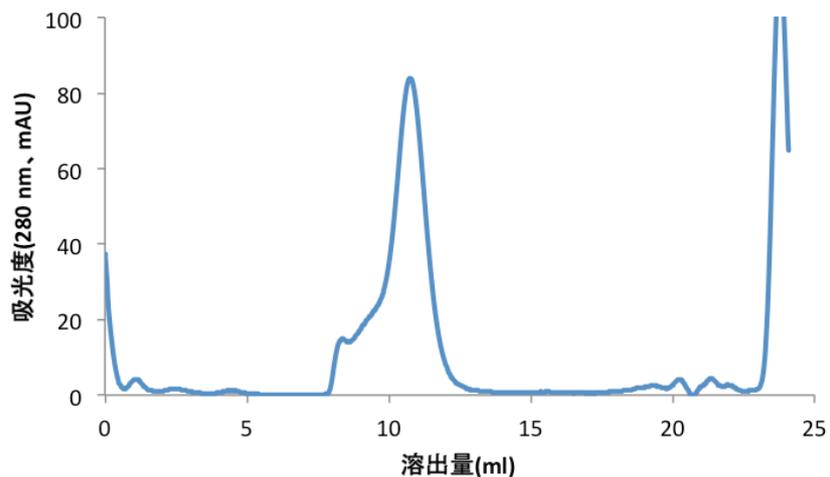


図 4-16 : MSP1AviC-MsbA-DMPG のサイズ排除クロマトグラフィー

第二章とほぼ同じ位置にピークが観察されたので MsbA は Cy3 化、ビオチン化された MSP1AviC に正しく包摂されたことが確認された。MsbA の存在比は 2.14 となりほぼ一つのナノディスクに一つの MsbA 機能体(二量体)が包摂されていることが確認された。

※SDS-PAGE のバンドは補足資料 S-13 を参照

4-10'. MSP1AviC-MsbA の DNA origami への固定化

以下に最終精製後のアガロースゲルの画像を示す。

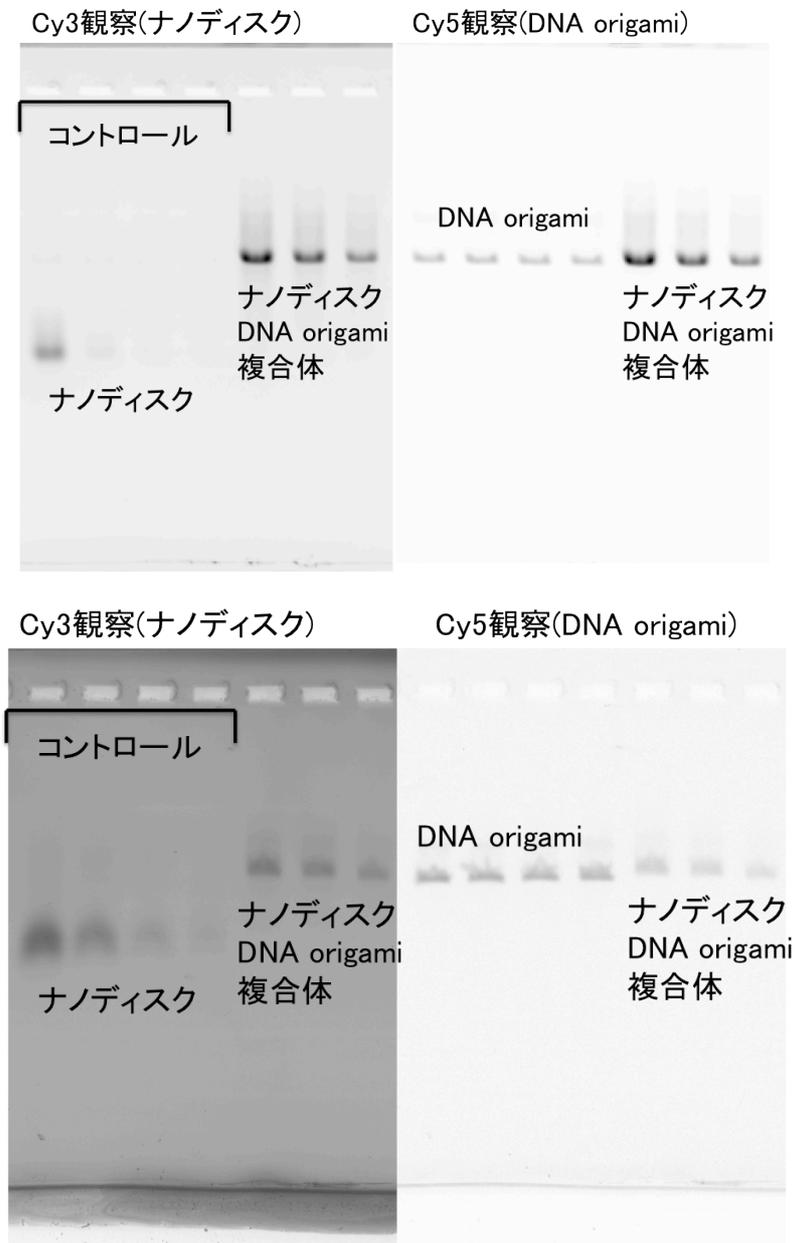


図 4-17: ナノディスクの DNA origami 上への固定化の確認(上の画像は 1B、
下の画像は 138B のものである)

コントロールは SA を加えずに DNA origami とナノディスクを混合したものであるのでナノディスクと DNA origami は別々に泳動される。SA を介してナノディスクを DNA origami 上に固定化するとナノディスクが DNA origami と同じ位置に泳動される。また、138B の DNA origami では 3 つのナノディスクが 1 つ

の DNA origami に結合するのでコントロールの位置に比べて泳動度が小さくなっている。コントロールのバンド比からナノディスク / DNA origami を算出すると以下のようなになる。

1B : 1.66 ± 0.15

138B : 5.13 ± 0.64

4-11'. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の観察

以下に観察された AFM の画像を示す。

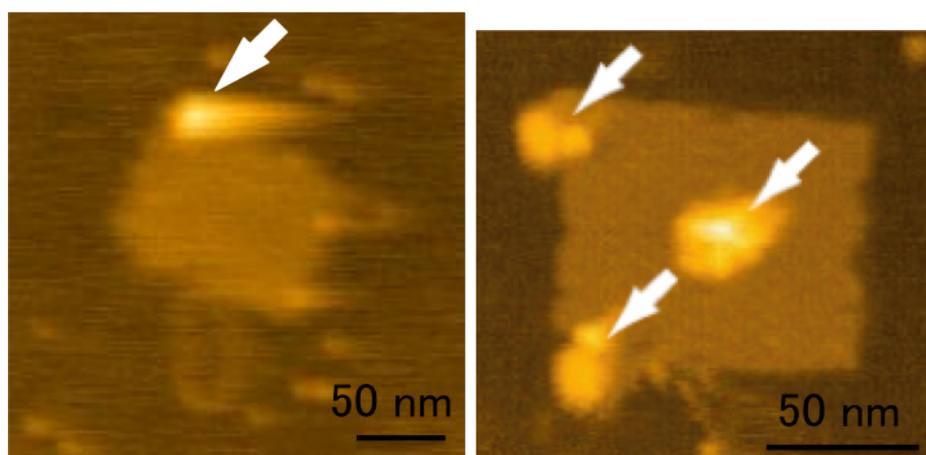


図 4-18 : MSP1AviC-MsbA-DNA origami の AFM 像(左の画像は 1B、右が 138B
で図の矢印の位置にナノディスクが結合)

図の矢印の位置がナノディスクである。1B では 1 の位置に 138B では 1, 3, 8 の位置にナノディスクが観察された。

4-12'. MSP1AviC-MsbA-DNA origami の酵素活性測定

以下に溶液中(Bulk)と 1B 及び 138B を用いた場合と ATP 加水分解活性及び酵素速度論定数を示す。

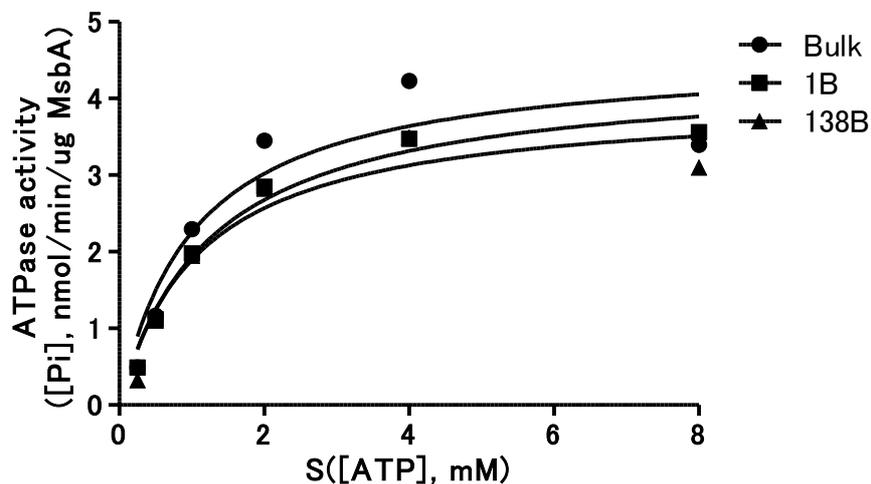


図 4-19 : DNA origami に固定化された MsbA の酵素速度論解析

表 4-2. DNA origami に固定化された MsbA の酵素速度論定数

	Bulk	1B	138B
Vmax (nmol / min / μ g MsbA)	4.58	4.35	3.99
k_{cat} (min ⁻¹)	295	281	258
K_M (mM)	1.03	1.25	1.11
k_{cat} / K_M	286	224	232

Bulk とほぼ同等かやや低い活性を有しており、他の酵素速度論定数も大して違いは見られなかった。

[考察]

本章ではまず SPR によって ATP の非加水分解性アナログである ATP- γ -S との結合を確認することに成功した。得られた RU はリガンドである MSP1-MsbA が 2763.2 固定化されたのに対してアナライトである ATP- γ -S を流した時は最大で 2.5 RU とその値はとても小さかった。しかしながら SPR では固定化されたリガンドとアナライトの分子量の比に比例してシグナルが検出されるので MSP1-MsbA の分子量が 270 kDa であり ATP- γ -S の分子量が二分子で 1038 であり分子量の比が 250 倍以上もあることを考慮に入れるとこの 2.5 RU という値は妥当であることがわかる。得られた K_D 値は MSP1 において 10^{-6} 程度、E3 においては 10^{-8} 程度となっており第三章で得られた AMPPNP における値とは E3 において異なっていた(MSP1、E3 共に 10^{-6} 程度)。これは前章と本章とでは用いた ATP 非加水分解性アナログが異なっていたためと本章では MsbA を固定化していたのでその影響が見られたのではないかと考えられる。SPR の測定では MsbA の HisTag を固定化に使用したが MsbA の HisTag は ATP 加水分解ドメインの近傍に存在するため固定化によって酵素速度論解析の時に観察された K_M の差がより顕著になったと考えられる。また、脂質によって K_D は 10^{-6} ~ 10^{-8} まで様々に変化したがこれらの脂質では頭部の親水基も尾部の疎水基も流動性も異なっているのでこの親和性の違いを理解するには更なる詳細な解析が必要となるだろう。従来は膜蛋白質の解析を SPR を用いて行う際は膜の安定性や使用できる脂質組成に制限があった。しかしながら、本章において全ての脂質において安定に測定を行うことが出来たことによって従来法と比較して SPR におけるナノディスクの有用性は示された。

次に、蛍光標識、ビオチン化されたナノディスクで MsbA を包摂し DNA origami 上での活性を測定することに成功した。酵素速度論定数が溶液中のものと同程度の値であったことからナノディスクは固定化の影響を受けないことが示された。また、1B、138B でも値に差が見られなかったことから DNA origami 上での位置は等価であると考えられる。 V_{max} や k_{cat} の値が第三章で得られた値よりも 2~3 倍程度高くなっていたがこれは測定系の違いによるものだと考えられる。第三章での加水分解の測定法だと分解された ADP が阻害剤として機能するが本章で行われた方法では分解された ADP が pyruvate kinase によって ATP に再生されるので ADP の阻害の影響を受けなかったと考えられる。今後複数種類の膜蛋白質を DNA origami 上に固定化し活性を測定することが可

能になれば本章の冒頭で述べたような多種多様な膜蛋白質群の反応を再現し解析を行うことが可能になると期待される。

第五章

総括

本論文の第二章においてまず MSP1、E1、E2、E3、MsbA の発現及び精製を行い、それらを用いてナノディスクの精製を行った。ナノディスクの精製を行った際に脂質との混合比や加える MSP の量を工夫することで均一な膜蛋白質試料の調製を行うことが出来た。均一な膜蛋白質試料の調製は非常に困難であったので従来は定性的な議論や、非常に限られた範囲でしか定量的な評価を行うことは出来なかった。本研究によって確立された膜蛋白質の均一化の技術を用いれば膜蛋白質の定量的評価が行えるようになるだけでなく電子顕微鏡や NMR を利用した構造解析など膜蛋白質の詳細な解析にも応用することが期待される。現在は脂質の流動性のためナノディスクを用いた結晶構造解析は行われていないがナノディスクは様々な脂質組成で膜蛋白質を可溶化できるので適切な脂質を用いることが出来れば膜蛋白質の結晶化も可能となるかもしれない。また、ナノディスクは包摂される分子の数を制御することができるのでシグナル伝達におけるレセプターの会合状態をモノマーやダイマーなどに制御し、それがシグナル伝達にどのような影響を及ぼすかを解析することも可能となるだろう。

第三章においては均一化されたナノディスクを用いて MsbA の生化学的及び物理化学的性質の定量的評価を行った。MsbA の熱力学的解析には今回初めて成功し、また、ナノディスクのサイズ依存性も初めて明らかにすることが可能となった。ナノディスクはサイズによって流動性を大きく変化させそれが MsbA の構造変化やそれに伴う活性に影響を与える。膜蛋白質はトランスロコンやトランスポーターなどに代表されるように機能する際に大きく構造を変化させるものが多い。ナノディスクはサイズを変えるという簡便な操作のみで流動性の制御、また、それに伴う膜蛋白質の構造変化も制御出来る可能性を有しているので構造変化を伴う膜蛋白質解析において非常に有用な解析手法であると言える。膜蛋白質と脂質との相互作用は頭部との相互作用、曲率や疎水部の変化による圧力、流動性など様々な要因が複雑に絡んでいるため相互作用を理解するには困難が付きまとう。リポソームなどを用いた従来法では例えば流動性の影響を観察するために新たな膜成分を加えると流動性だけでなく他の要因まで変化する可能性がある。ナノディスクは膜組成を変えることなく流動性の制御を行うことができるので脂質と膜蛋白質の相互作用を従来法と比較してより明確に理解できると言える。

第四章では SPR を用いた結合解析と DNA origami 上での活性測定を行った。

SPR を用いた膜蛋白質の結合解析はその膜蛋白質の機能を理解する上で非常に有効な手段であるが従来の膜構築法では安定性や使用できる脂質に制限があるなど問題があった。本研究において様々な脂質組成のナノディスクを用いて安定的に MsbA と基質である ATP- γ -S の結合解析を行うことができることを示した。このことから従来法と比較して SPR を用いたナノディスクの有用性は示された。膜蛋白質は現在のドラッグターゲットの約 50%を占めているため、SPR を用いたターゲット膜蛋白質と化合物ライブラリとの相互作用をスクリーニングする手法は創薬へ大きく貢献することが期待される。また、このような速度論的測定と ITC などの熱力学的測定と組み合わせることによって膜蛋白質とリガンドとの詳細な結合様式を理解することなども期待される。

実際の生体膜上では多種多様な膜蛋白質が連携して機能を果たしている。このように複雑な反応を解析するには分子の種類や分子同士の距離といった空間配置を制御することが必要であるが従来の技術では困難であった。本研究では DNA origami 上でのナノディスクの位置を制御することに成功し、固定された MsbA が固定されていない MsbA と同等の活性を保っていたことを示した。また、DNA origami 上の位置を変化させても活性は変わらなかったため活性を保ったまま膜蛋白質の配置を自由に設計できる可能性も示した。今後複数種類の膜蛋白質や可用性の蛋白質を固定することが可能となれば上述したような膜蛋白質の複雑な反応系を再現し、解析を行うことが期待される。例えば細胞接着などにおいては接着分子の数や種類、配置を変化させることによってそれぞれが細胞への接着に与える寄与を分子単位で明確に記述することが可能となるだろう。また、ウィルスなどの膜融合やグラム陰性菌などの膜輸送に関連する膜蛋白質の機能解析では 2 つの膜が適切な位置関係にある必要があるが、従来ではそのような反応系を構築することは困難であった。DNA origami では平面的な形状だけでなく立体的な形状も構築することができるので 2 つの膜の空間配置を自由に設計しこのような膜蛋白質の機能解析も行うことが期待される。ミトコンドリアの電子伝達系などに代表される電位差や濃度差を利用した反応系は膜蛋白質の向きを揃える必要があるが従来法では困難であった。DNA origami を用いて電流の制御や箱状の構造物への分子の流入の制御を行うことが出来るので DNA origami を用いてナノディスクの向きを揃え、電氣的・濃度的な制御を行った上でこのような反応系の解析も行える可能性を有している(66)。さらに、DNA origami 上でシグナル伝達分子、RNA ポリメラーゼ、リボ

ソームなどを配置することで外部刺激に応答する発現制御装置を構築することも将来的に可能となることが期待される。

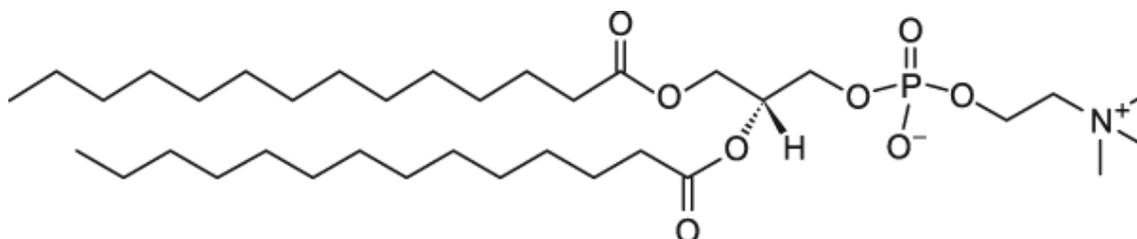
このようにナノディスクは膜蛋白質の生化学的及び物理化学的性質の定量的評価や脂質—膜蛋白質間の相互作用などといった膜蛋白質の基礎的な解析を行うのに適しているのみならず、**SPR** や **DNA origami** などと組み合わせることによって応用的な解析や利用法にも有効な手段であると言えるだろう。

補足資料

S-1. 脂質の構造式

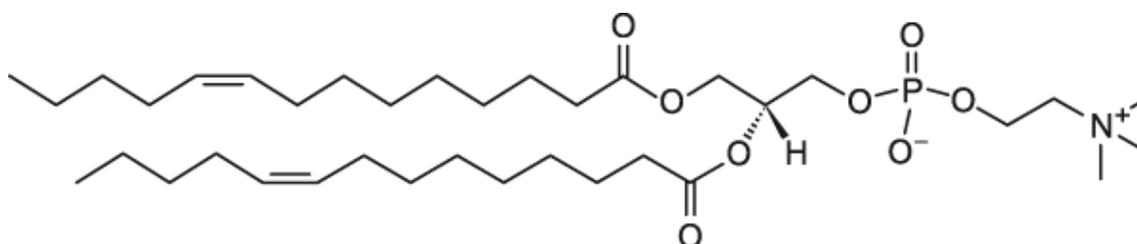
DMPC : 1, 2 - dimyristoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

転移温度 : 23°C



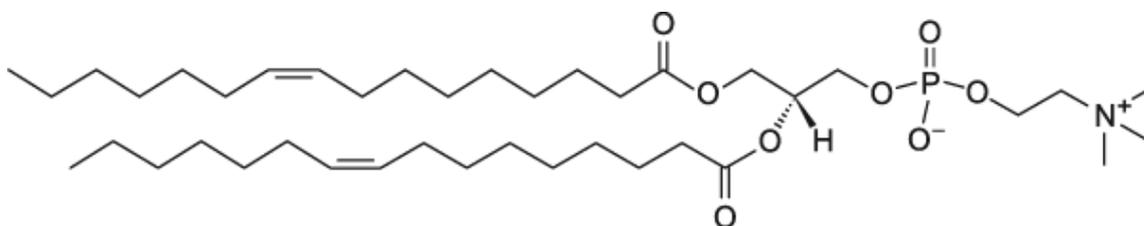
DM(9:cis)PC : 1,2-dimyristoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

転移温度 : 不明



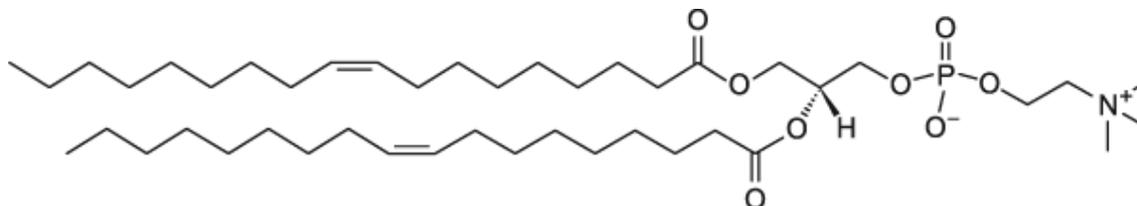
DP(9:cis)PC : 1, 2 - dipalmitoleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

転移温度 : 不明



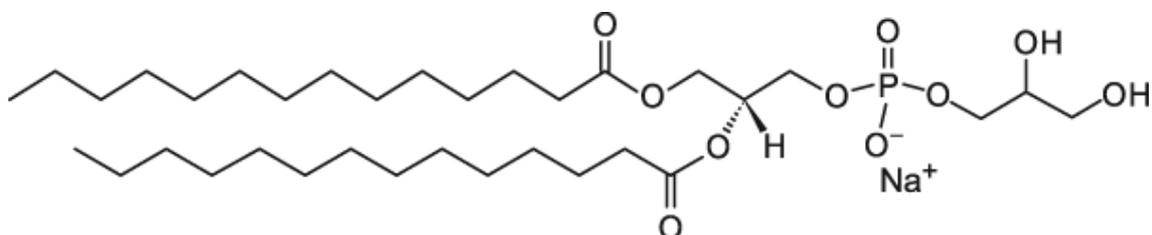
DOPC : 1, 2 - dioleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholine

転移温度 : -20°C



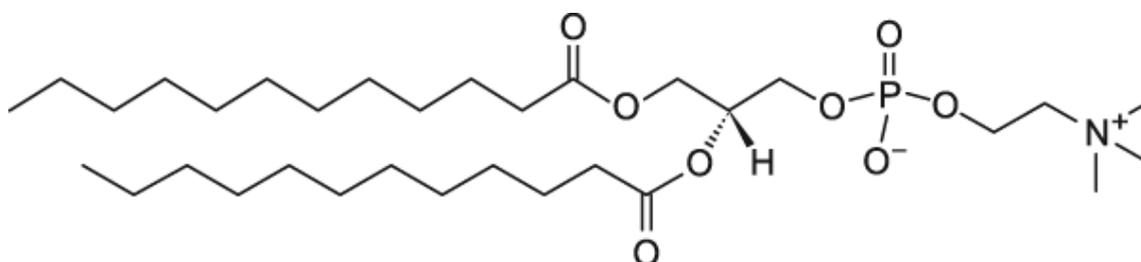
DMPG : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)

転移温度 : 23°C



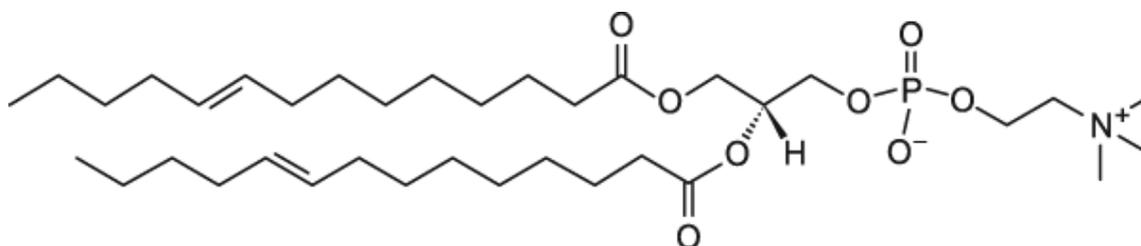
DLPC : 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

転移温度 : -1°C



DM(9:trans)PC : 1,2-dimyristelaidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

転移温度 : 不明



S-2. 各 MSP-MsbA における脂質の混合比の変化

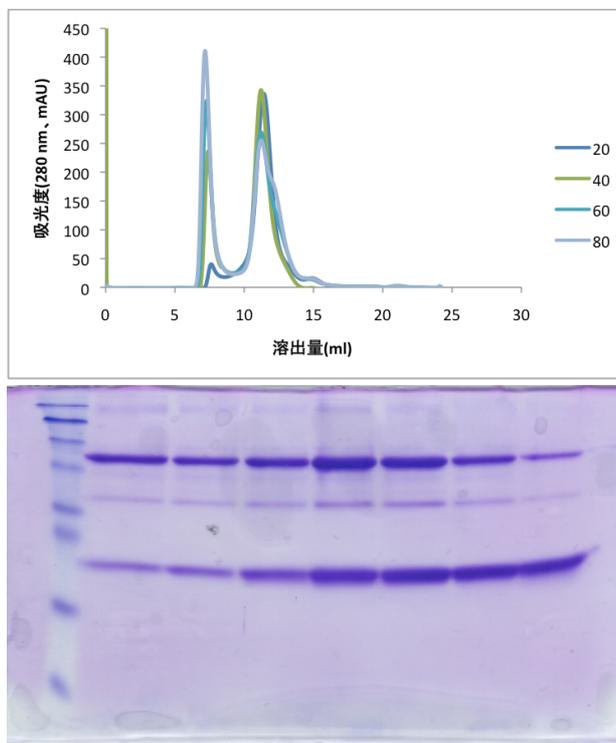


図 S-2-1 : E1-MsbA のクロマトグラム及び SDS-PAGE

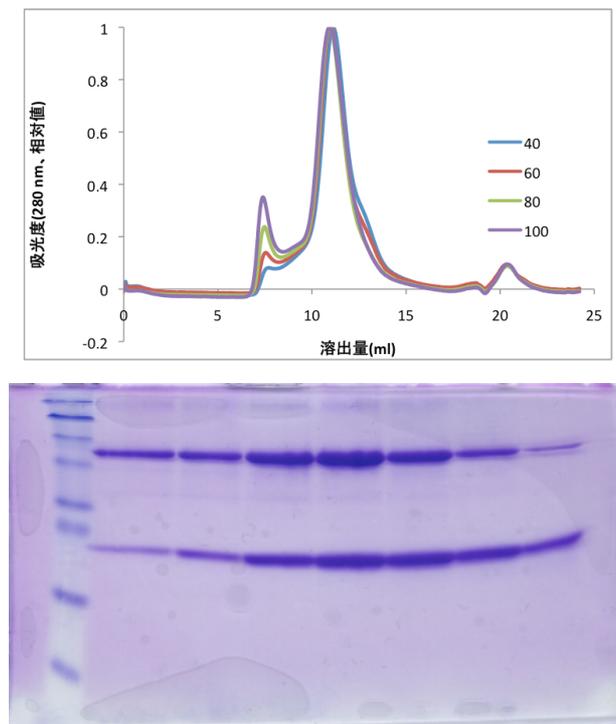


図 S-2-2 : E2-MsbA のクロマトグラム及び SDS-PAGE

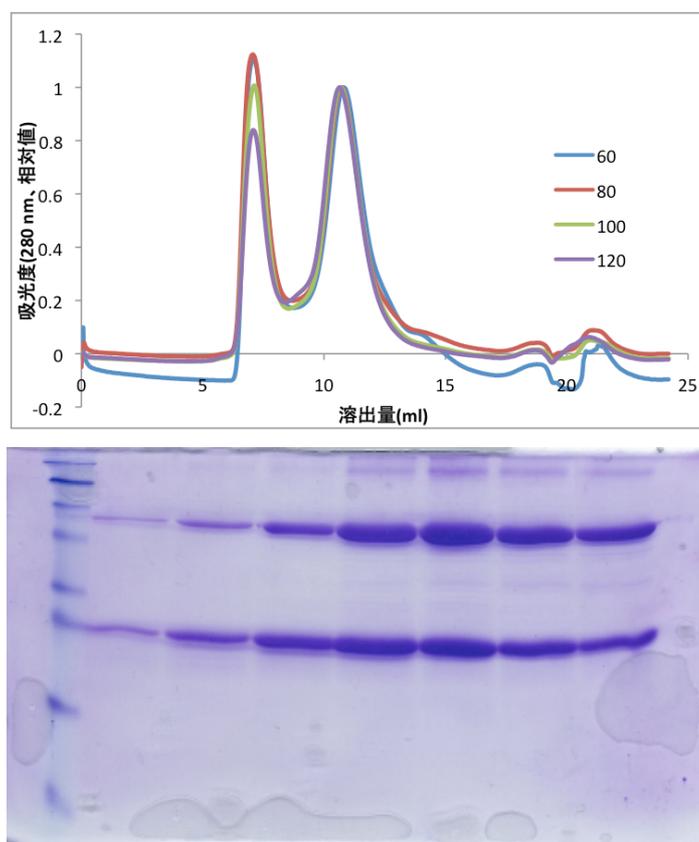


図 S-2-3 : E3-MsbA のクロマトグラム及び SDS-PAGE

S-3. E3-MsbA における MSP の混合比の変化

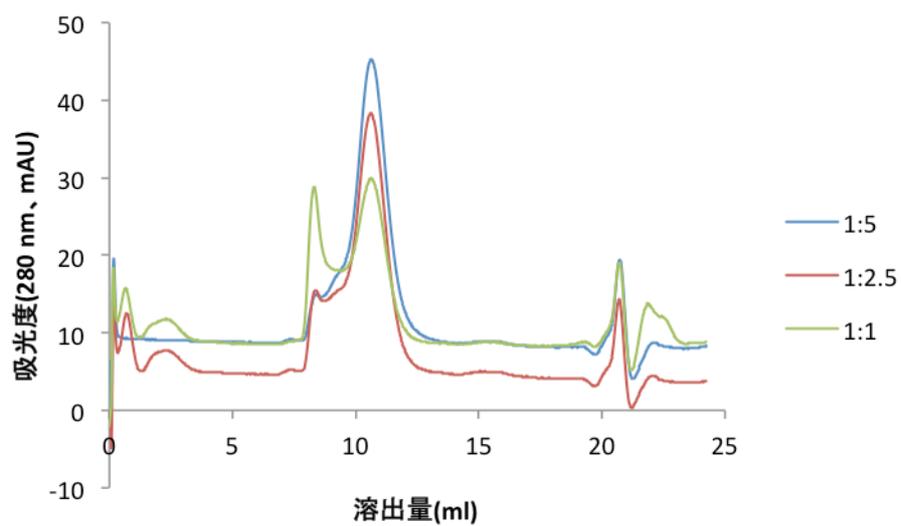


図 S-3 : E3-MsbA におけるクロマトグラム

S-4. DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC を用いた時のクロマトグラム

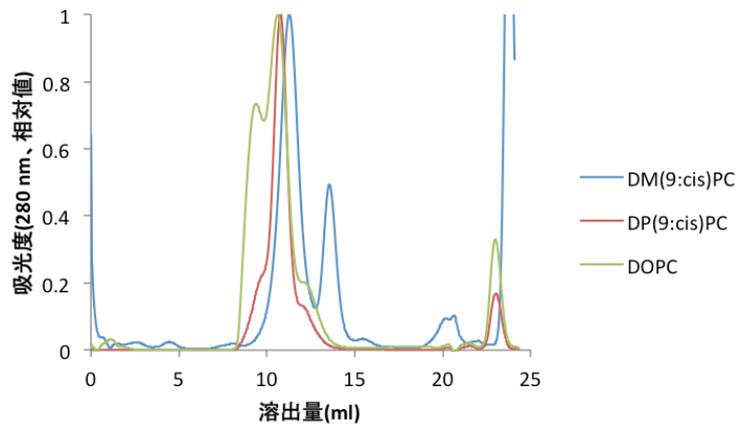


図 S-4 : DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC を用いた時のクロマトグラム

S-5. 各 MSP、各脂質の MsbA の存在比の決定

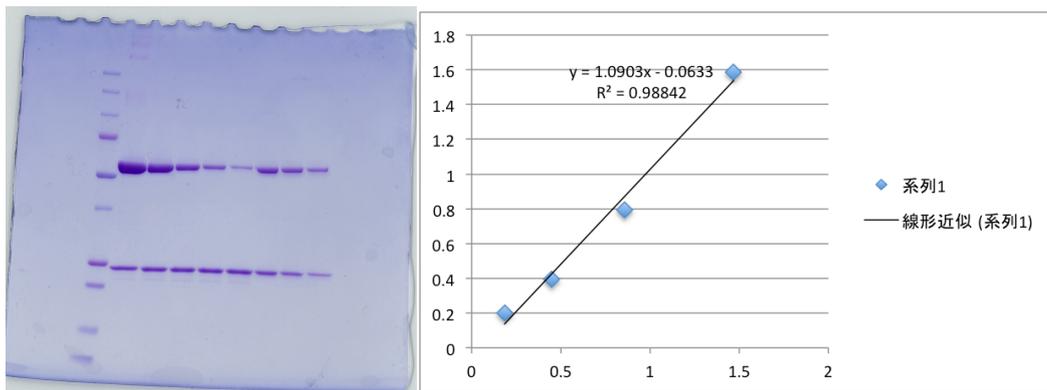


図 S-5-1 : E1 における MsbA の存在比の決定

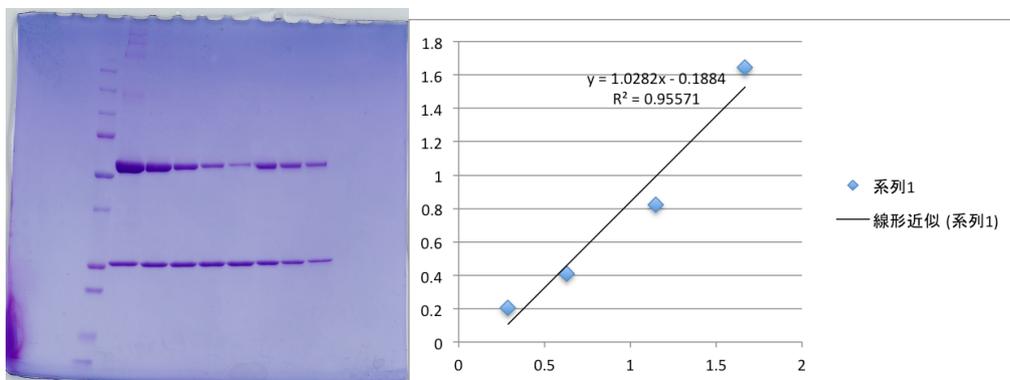


図 S-5-2 : E2 における MsbA の存在比の決定

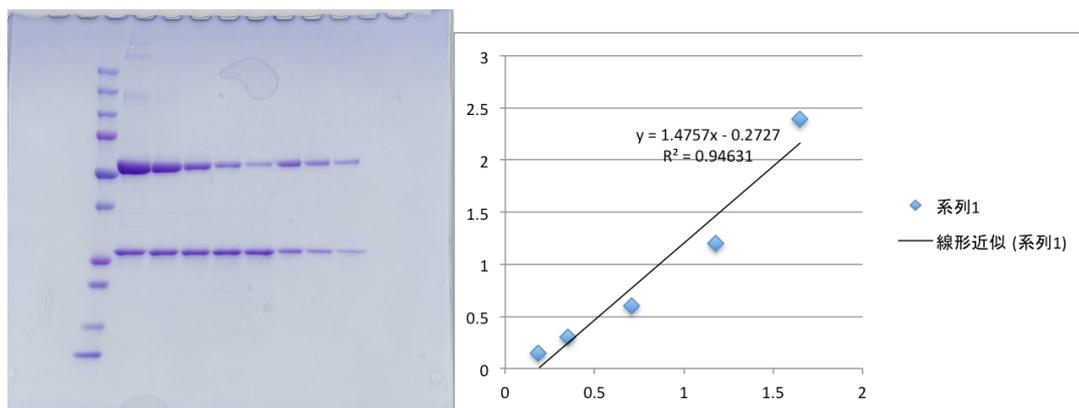


図 S-5-3 : E3 における MsbA の存在比の決定

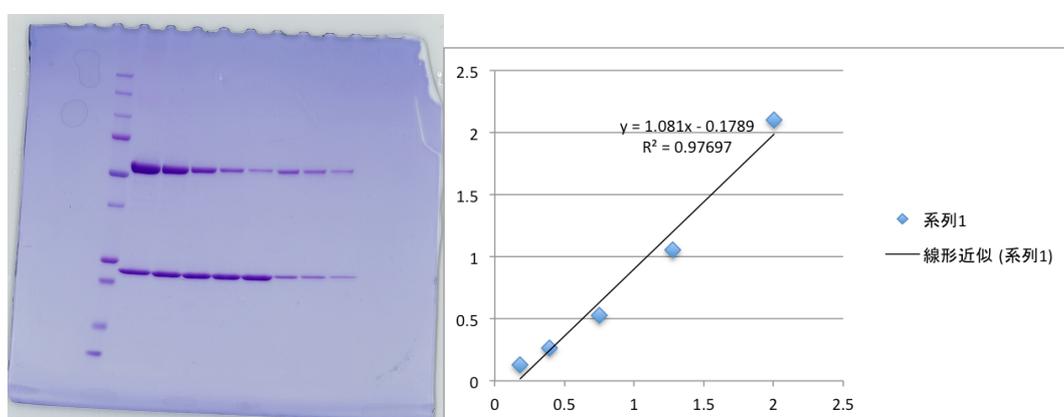


図 S-5-4 : DM(9:cis)PC における MsbA の存在比の決定

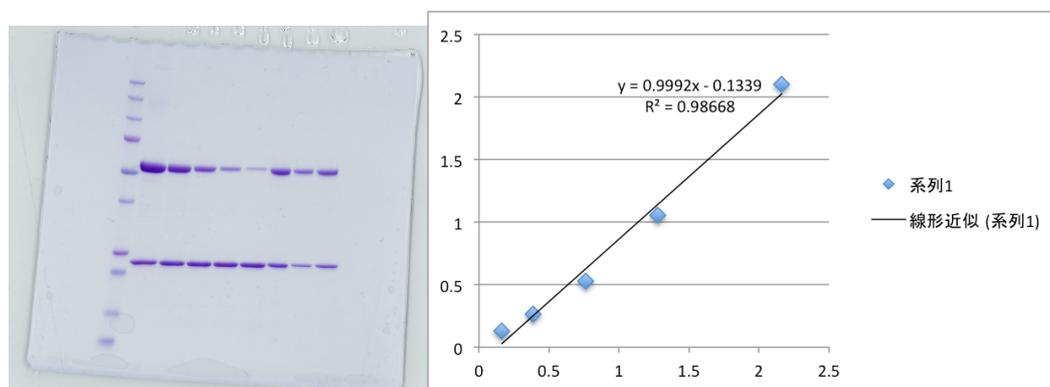


図 S-5-5 : DP(9:cis)PC における MsbA の存在比の決定

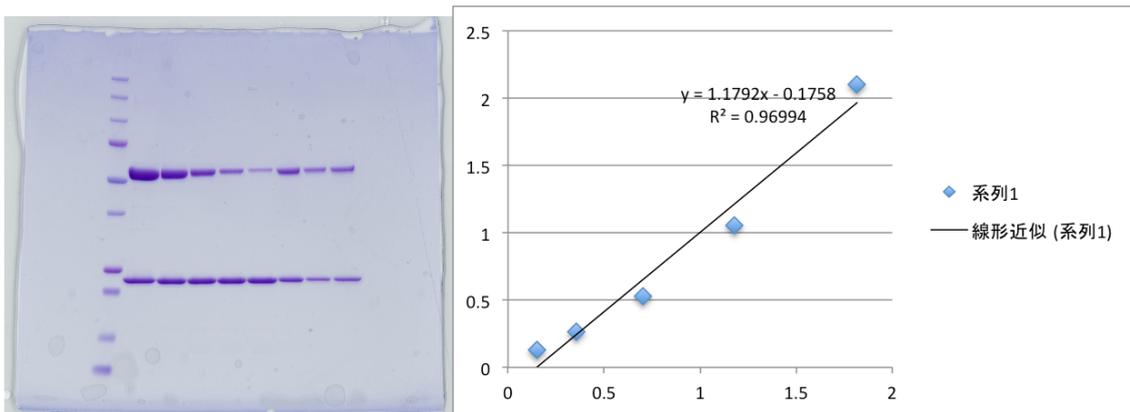


図 S-5-6 : DOPC における MsbA の存在比の決定

S-6. DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC を用いた時の MsbA の存在比

表 S-1 : DM(9:cis)PC、DP(9:cis)PC、DOPC を用いた時の MsbA の存在比

	DM(9:cis)PC	DP(9:cis)PC	DOPC
MsbA / ナノディスク	2.28	2.46	2.71

S-7. 各 MSP-MsbA における DSC 曲線

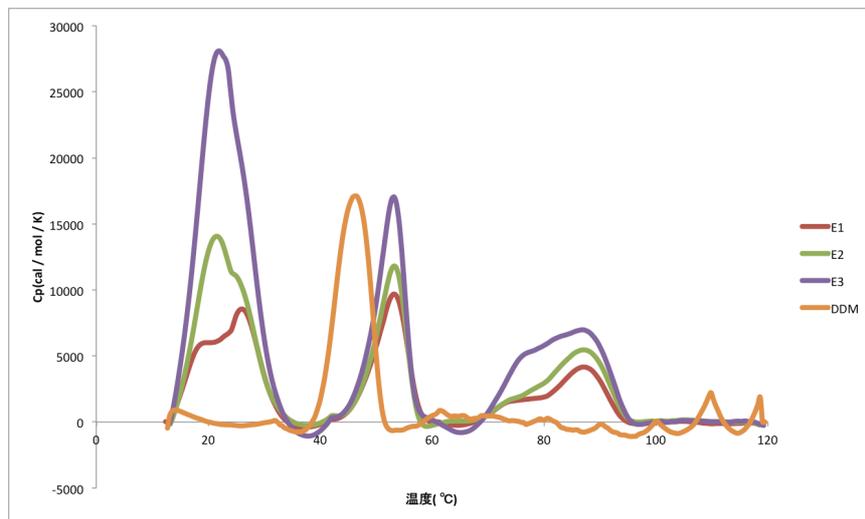


図 S-7-1 : AMPPNP 非存在下での DSC 曲線

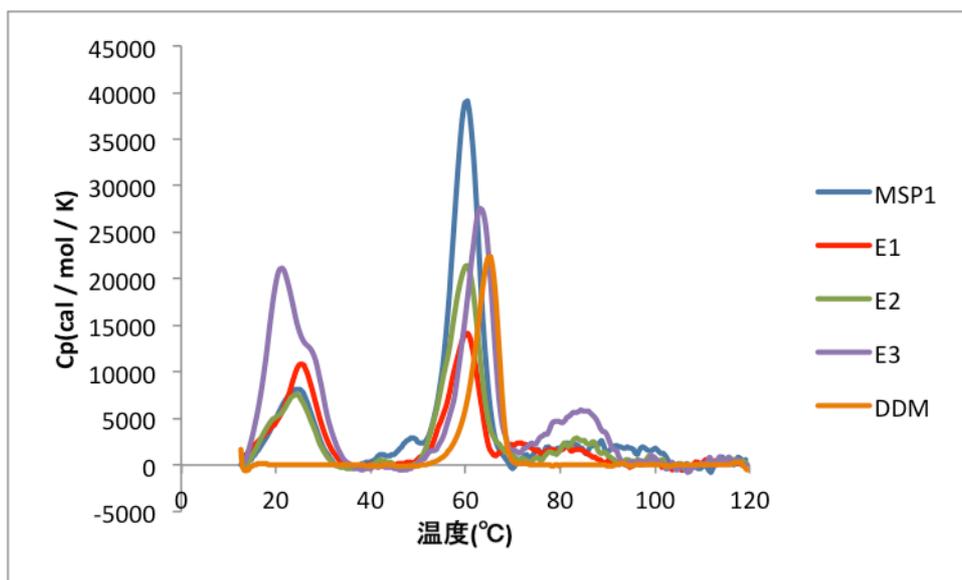


図 S-7-2 : AMPPNP 存在下での DSC 曲線

S-8. 20°Cにおける ITC 滴定曲線

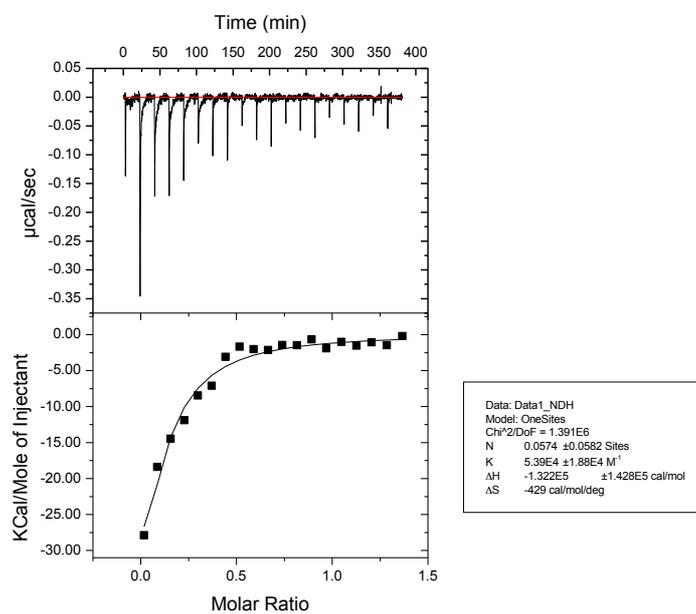


図 S-8-1 : MSP1 を用いた時の滴定曲線

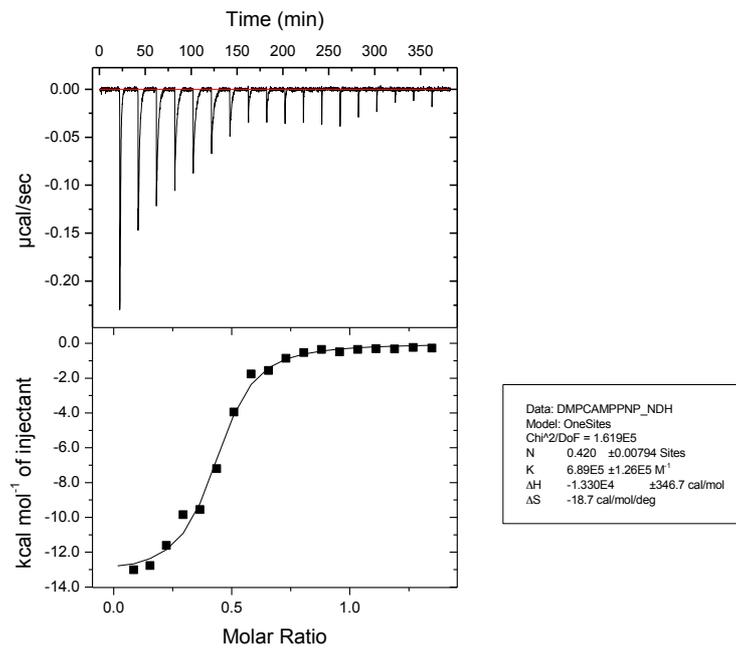


図 S-8-2 : E1 を用いた時の滴定曲線

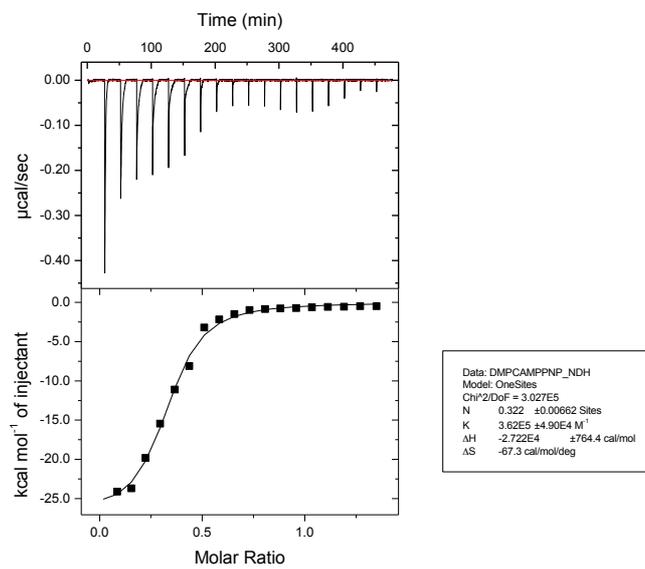


図 S-8-3 : E2 を用いた時の滴定曲線

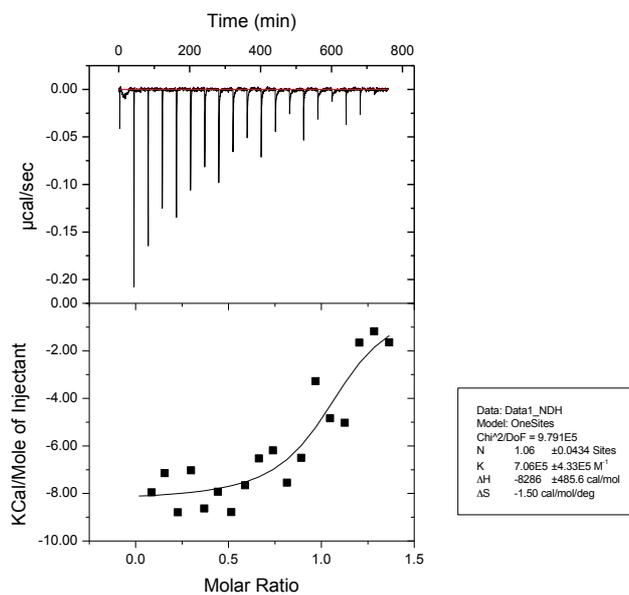


図 S-8-4 : E3 を用いた時の滴定曲線

表 S-2 : 20°Cにおける熱力学定数

	MSP1	E1	E2	E3
$K_A(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	0.539	6.89	3.62	7.06
$\Delta G(\text{kcal} / \text{mol})$	-6.303	-7.8209	-7.4811	-7.8505
$\Delta H(\text{kcal} / \text{mol})$	-132	-13.3	-27.2	-8.29
$-T \Delta S(\text{kcal} / \text{mol})$	125.697	5.4791	19.7189	0.4395

S-9. 25°Cにおける ITC 滴定曲線

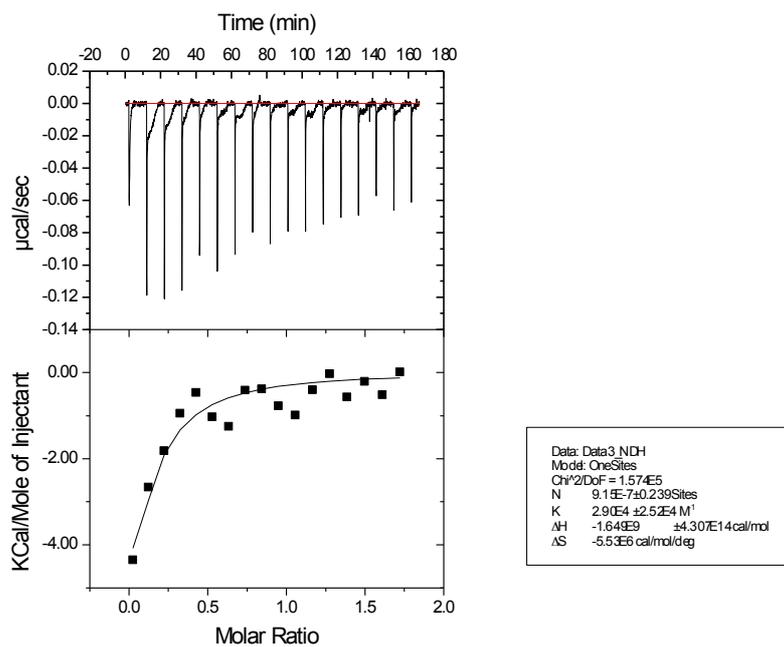


図 S-9-1 : DDM を用いた時の滴定曲線

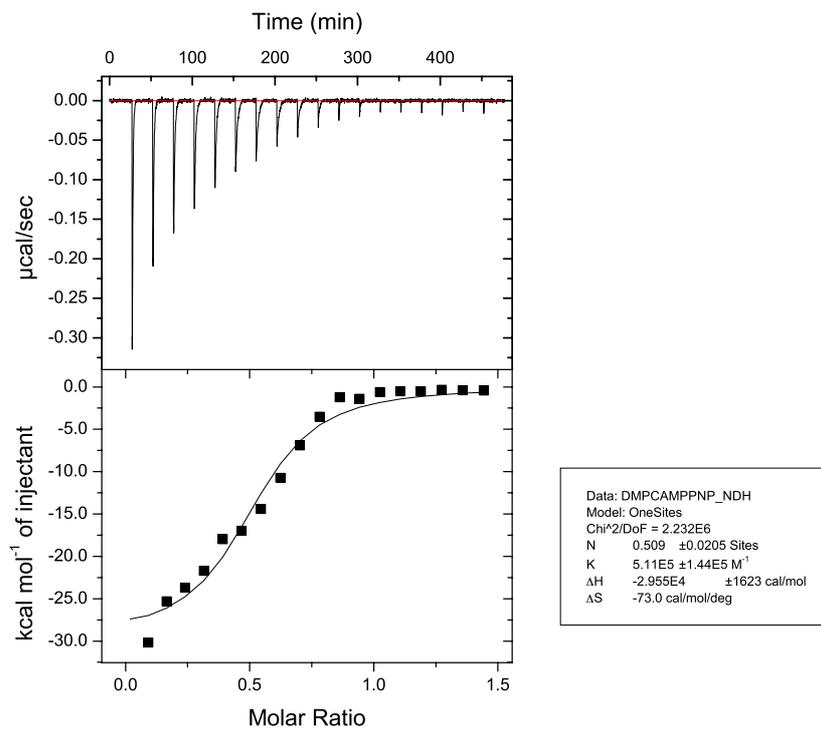


図 S-9-2 : E1 を用いた時の滴定曲線

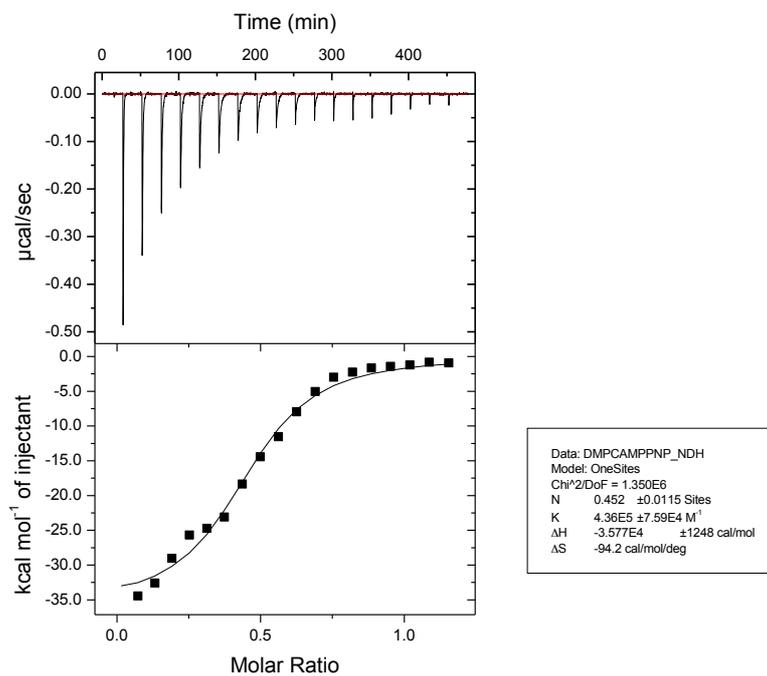


図 S-9-3 : E2 を用いた時の滴定曲線

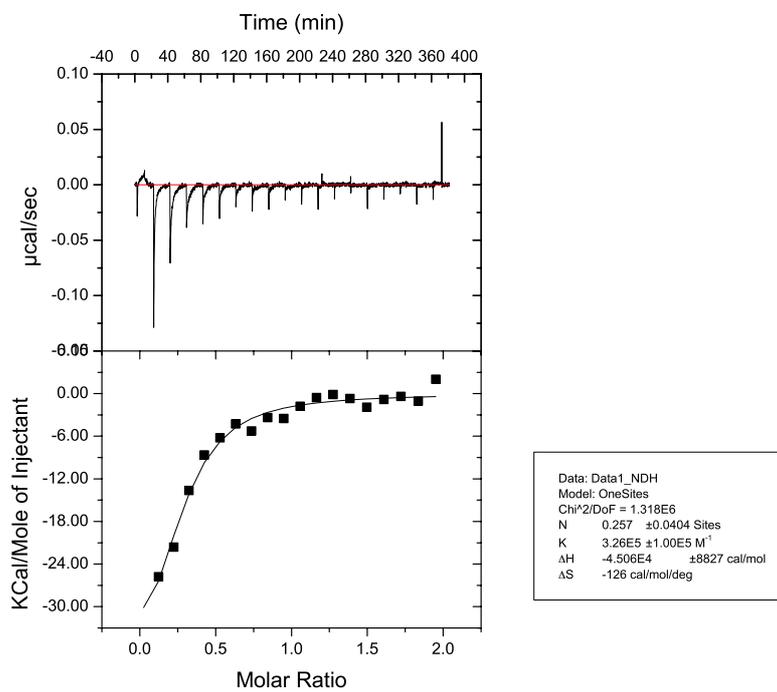


図 S-9-4 : E3 を用いた時の滴定曲線

S-10. Mg²⁺非存在下の各 MSP-MsbA における蛍光スペクトル

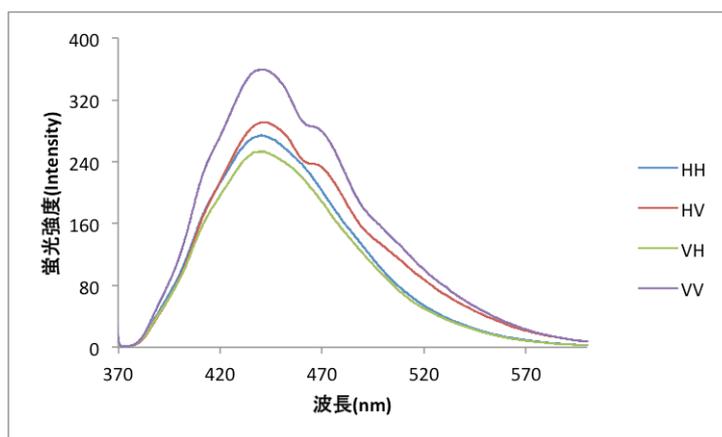


図 S-10-1 : E1-MsbA の蛍光スペクトル

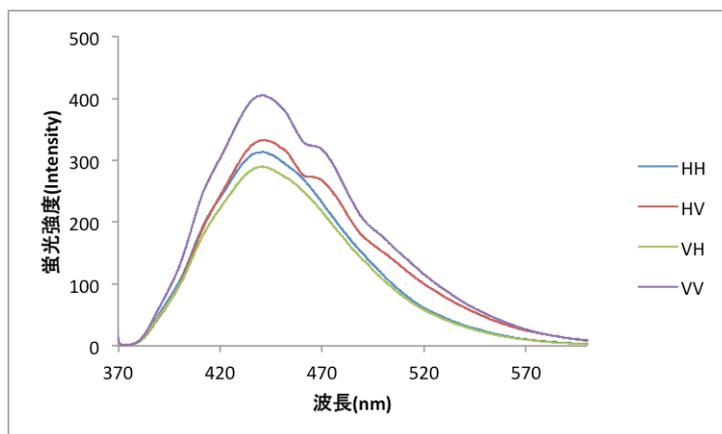


図 S-10-2 : E2-MsbA の蛍光スペクトル

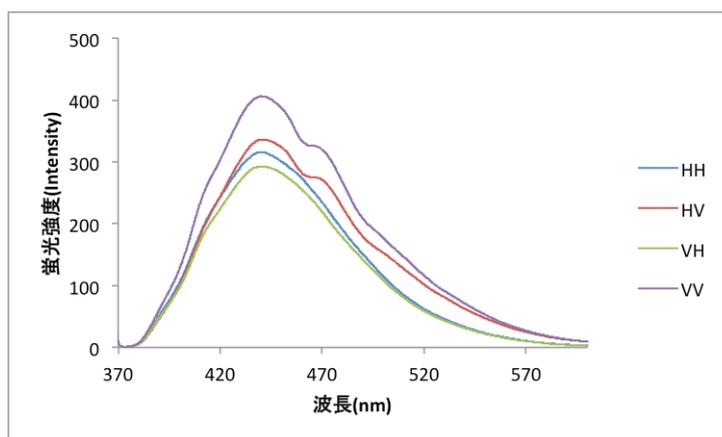


図 S-10-3 : E3-MsbA の蛍光スペクトル

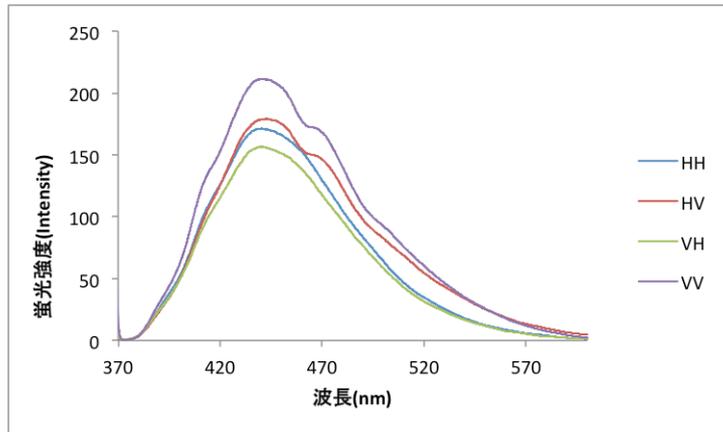


図 S-10-4 : DM(9:cis)PC-MsbA の蛍光スペクトル

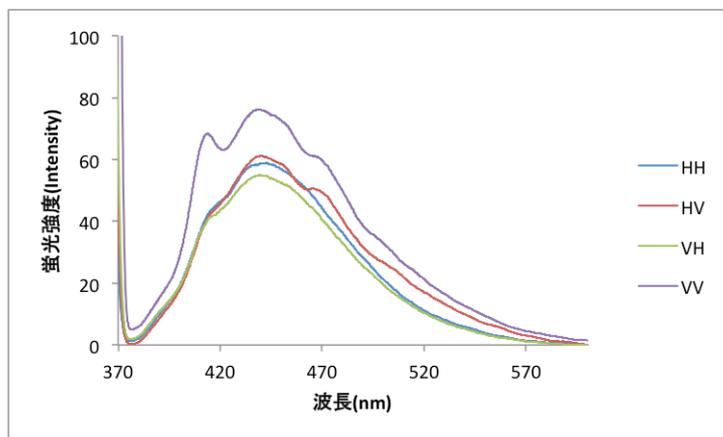


図 S-10-5 : DP(9:cis)PC-MsbA の蛍光スペクトル

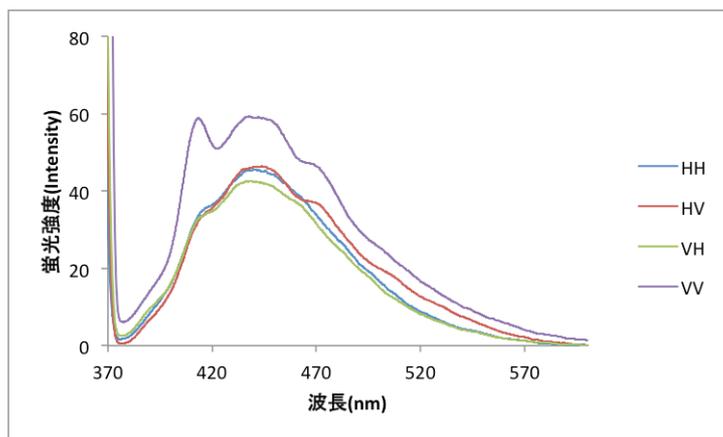


図 S-10-6 : DOPC-MsbA の蛍光スペクトル

S-11. Mg^{2+} 存在下の各 MSP-MsbA における蛍光スペクトル

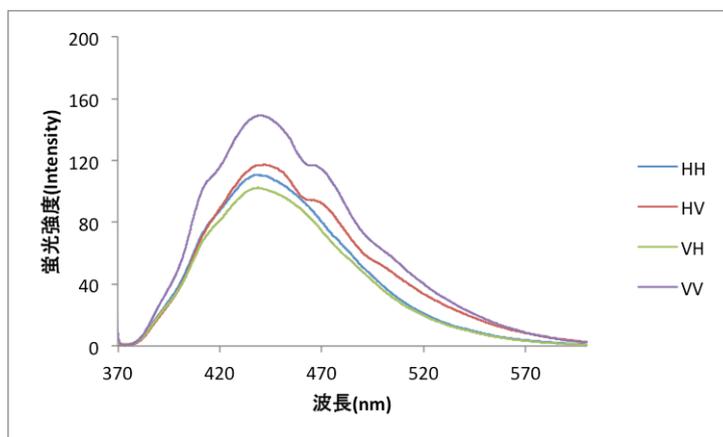


図 S-11-1 : MSP1-MsbA の蛍光スペクトル

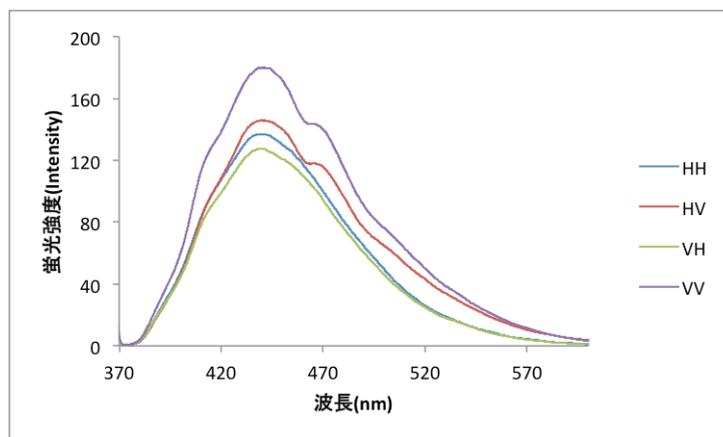


図 S-11-2 : E1-MsbA の蛍光スペクトル

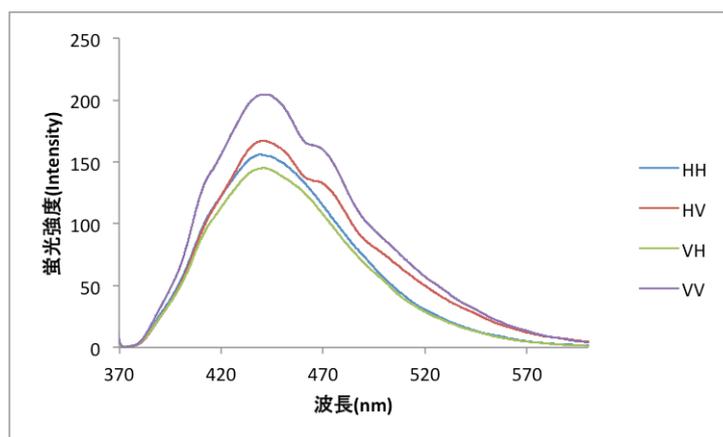


図 S-11-3 : E2-MsbA の蛍光スペクトル

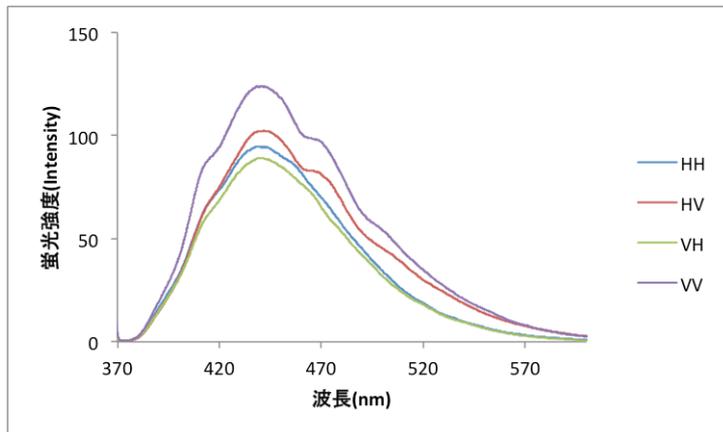


図 S-11-4 : E3-MsbA の蛍光スペクトル

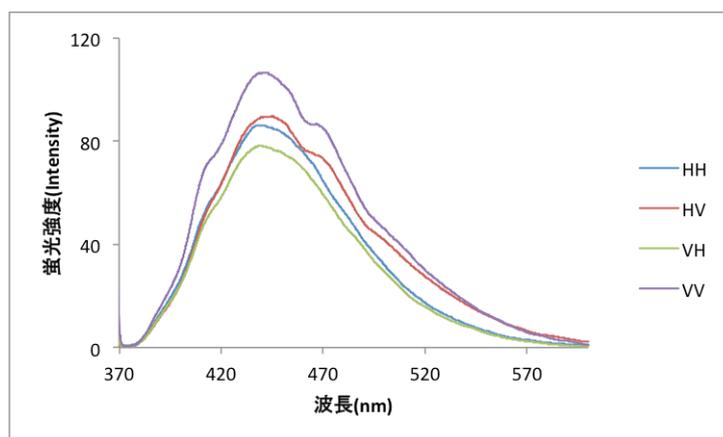


図 S-11-5 : DM(9:cis)PC-MsbA の蛍光スペクトル

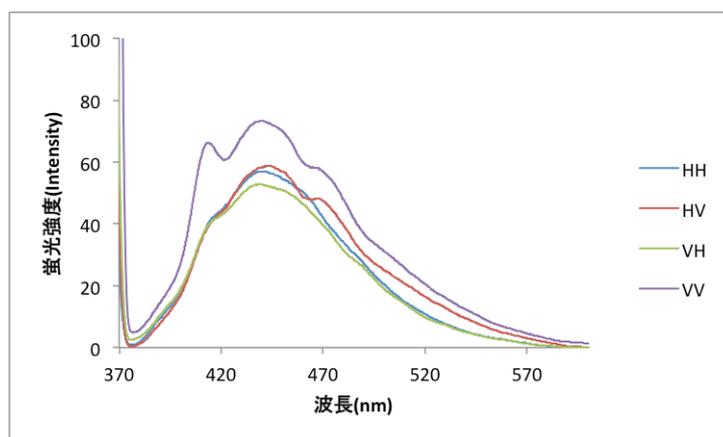


図 S-11-6 : DP(9:cis)PC-MsbA の蛍光スペクトル

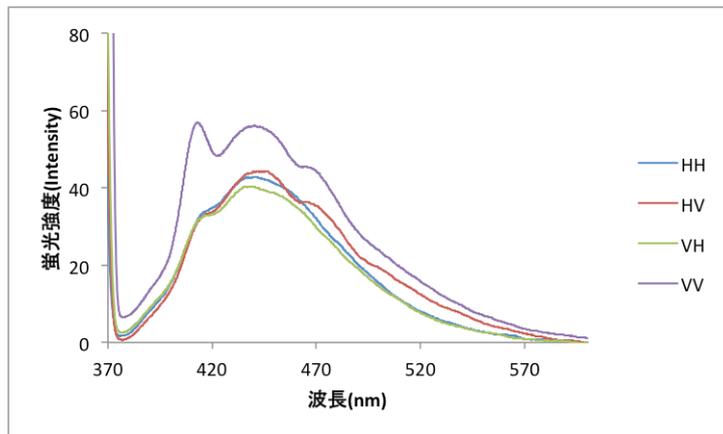
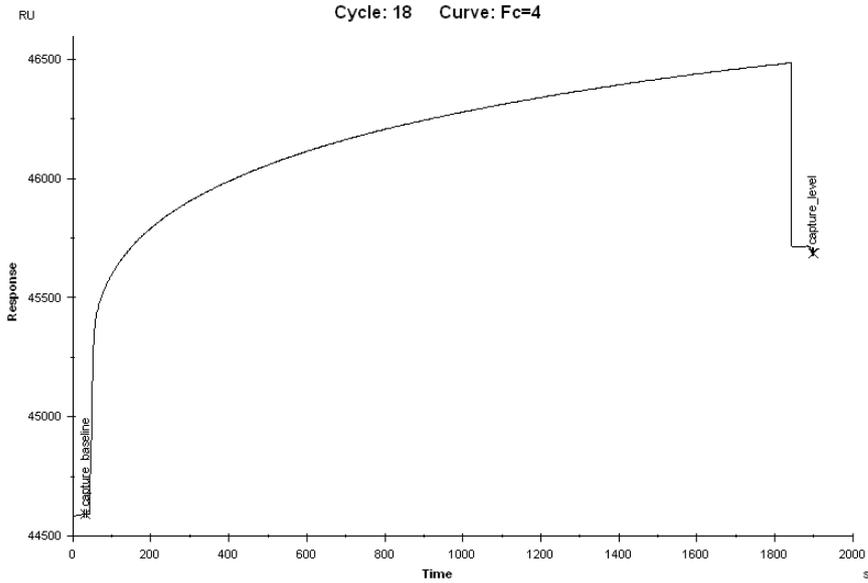


図 S-11-7 : DOPC-MsbA の蛍光スペクトル

S-12. MSP1, E3-MsbA-DMPC, DMPG, DOPC, DLPC, DM(9:cis)PC, DM(9:trans)PC における ATP- γ -S との結合解析



固定化量：1097.5 RU

Fig. S-12-1-1 : MSP1-MsbA-DMPG のキャプチャー

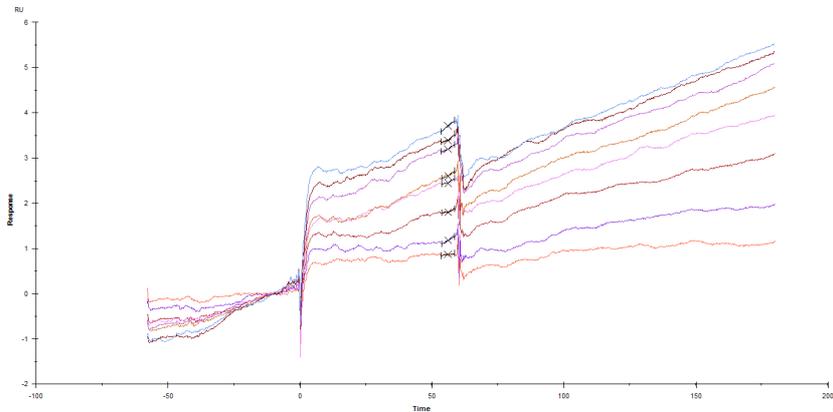


Fig. S-12-1-2 : MSP1-MsbA-DMPG のセンサグラム

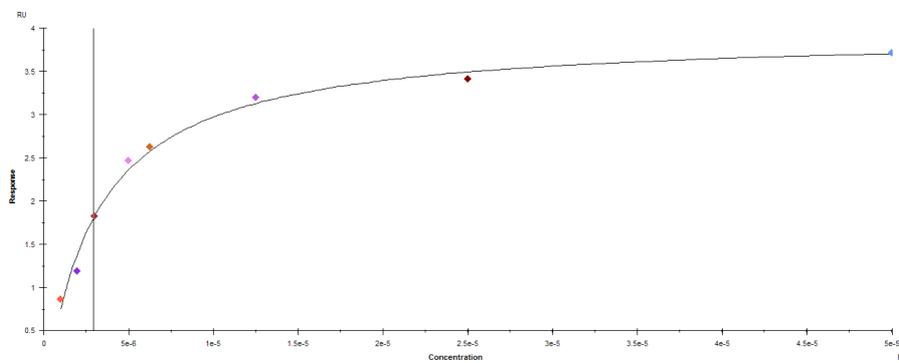
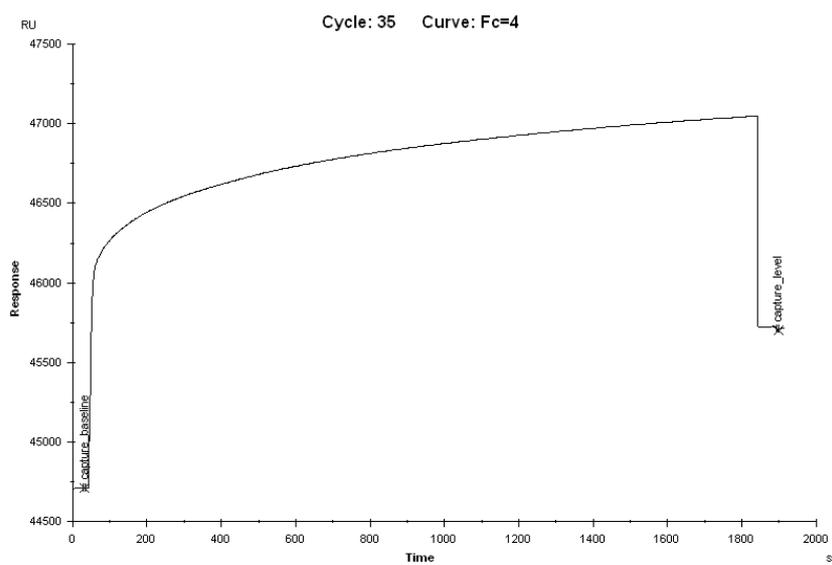


Fig. S-12-1-3 : MSP1-MsbA-DMPG のスキャッチャードプロット



固定化量 : 990.1 RU

Fig. S-12-2-1 : MSP1-MsbA-DOPC のキャプチャー

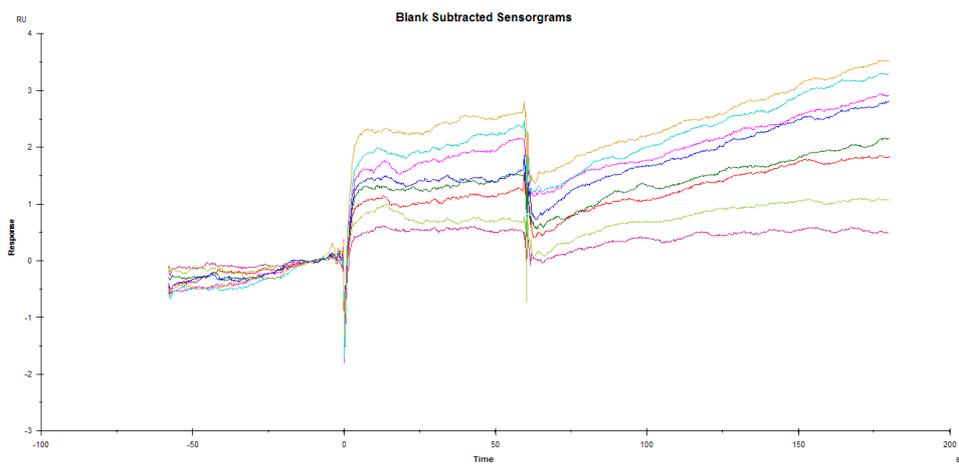


Fig. S-12-2-2 : MSP1-MsbA-DOPC のセンサグラム

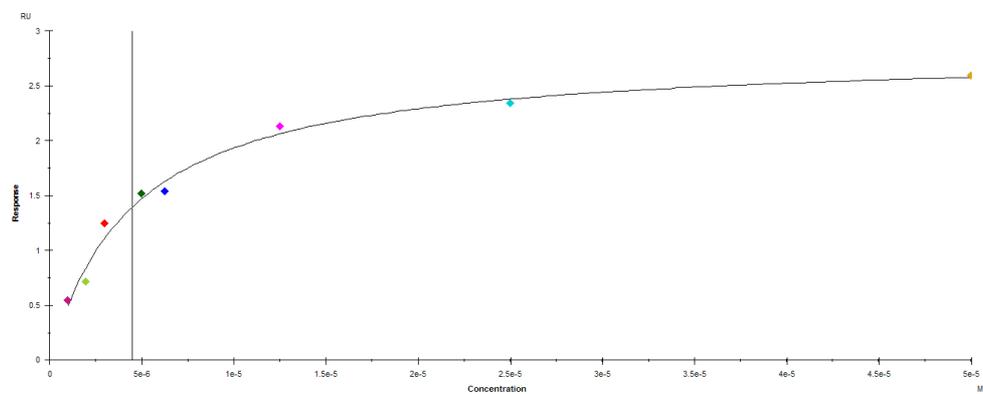
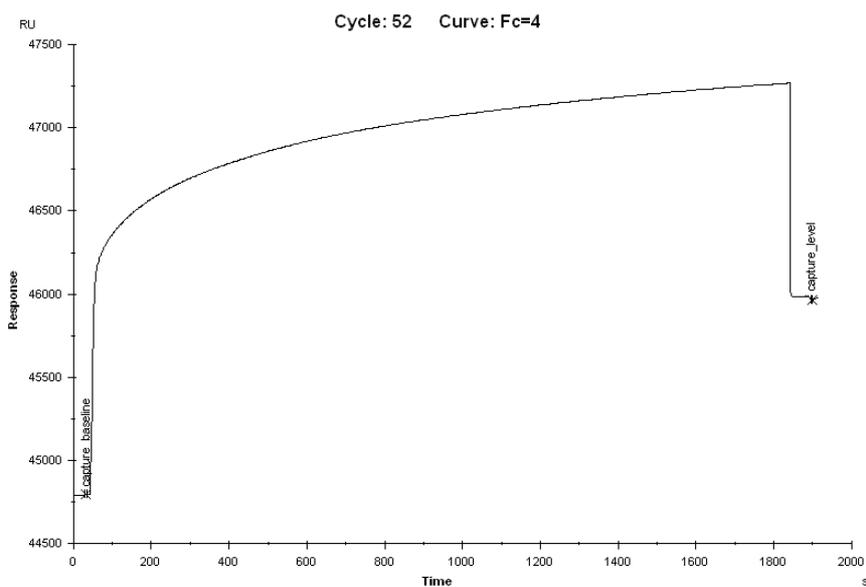


Fig. S-12-2-3 : MSP1-MsbA-DOPC のスキャッチャードプロット



固定化量 : 1170.0 RU

Fig. S-12-3-1 : MSP1-MsbA-DLPC のキャプチャー

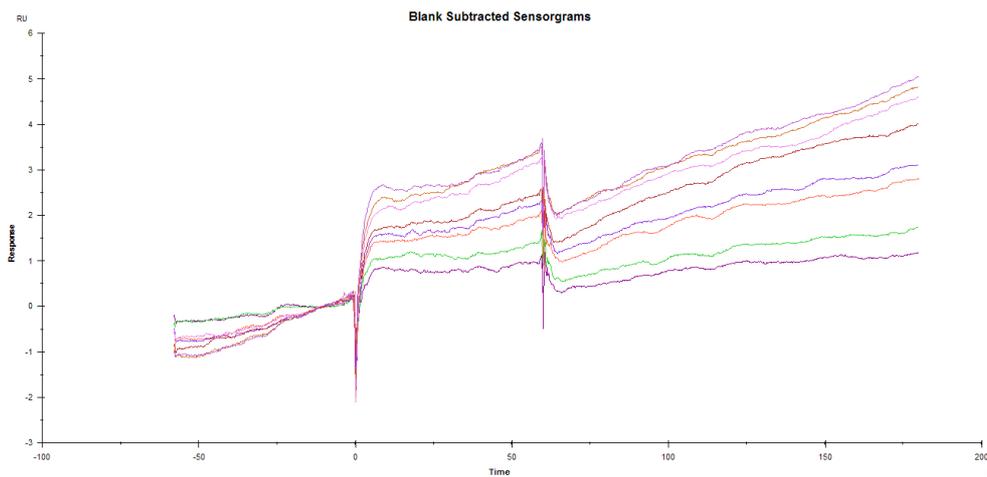


Fig. S-12-3-2 : MSP1-MsbA-DLPC のセンサグラム

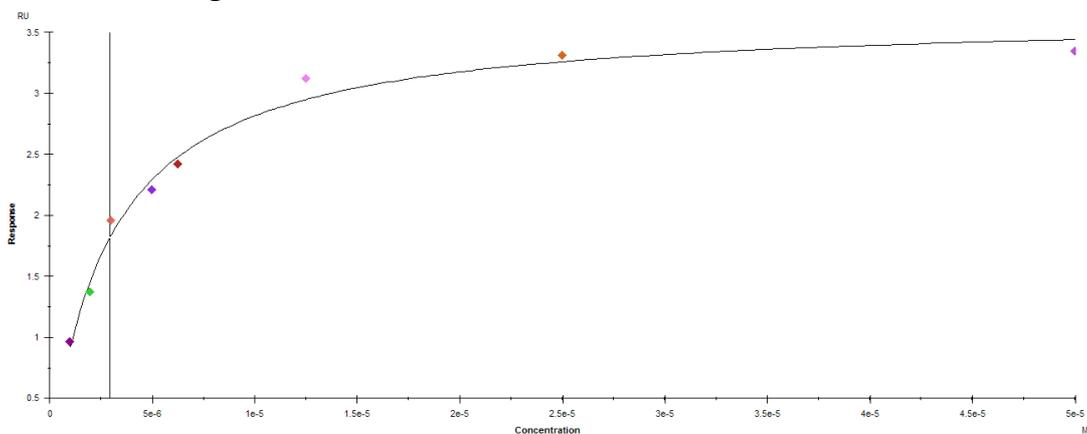
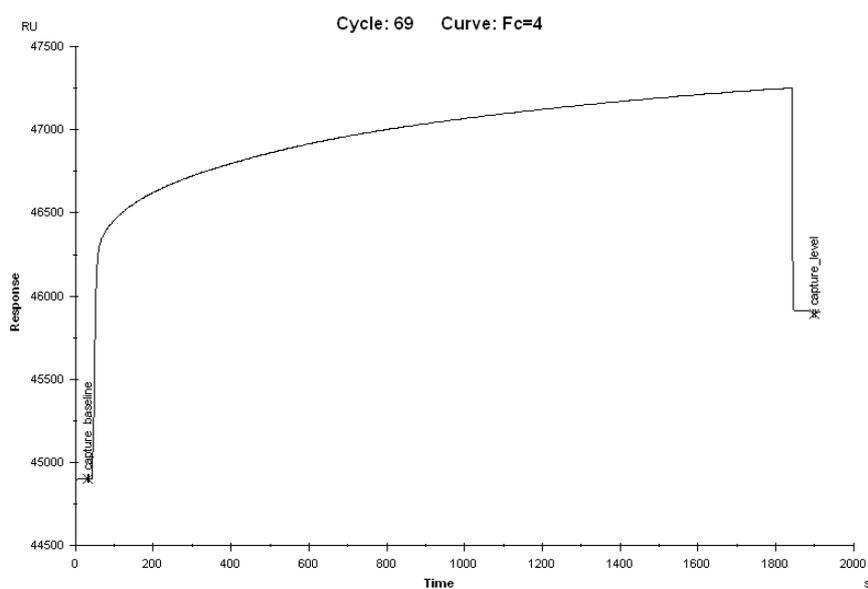


Fig. S-12-3-3 : MSP1-MsbA-DLPC のスキャッチャードプロット



固定化量 : 989.8 RU

Fig. S-12-4-1 : MSP1-MsbA-14-cis のキャプチャー

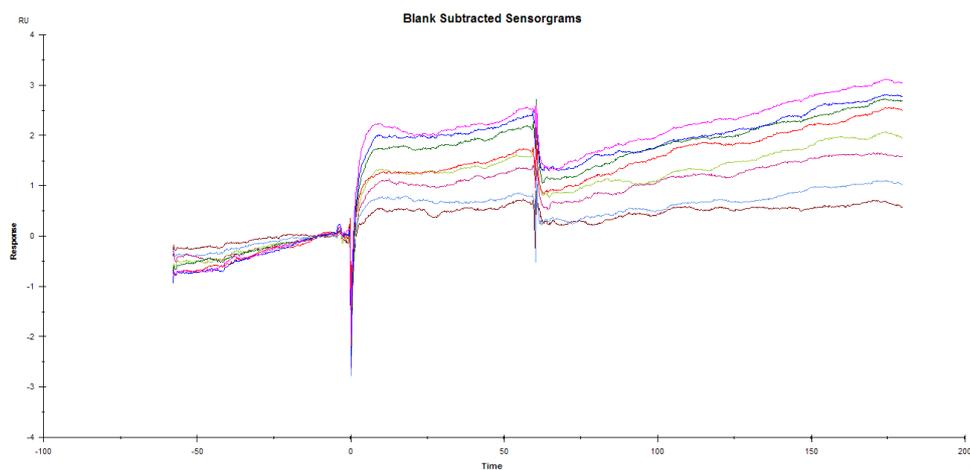


Fig. S-12-4-2 : MSP1-MsbA-14-cis のセンサグラム

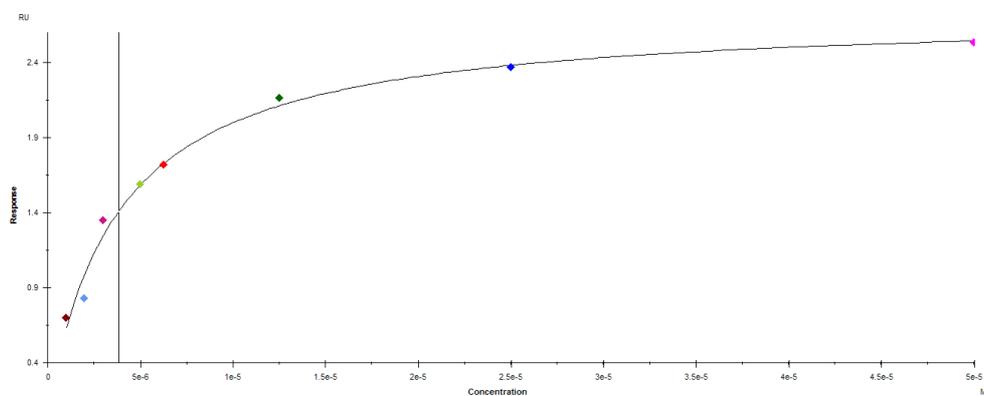
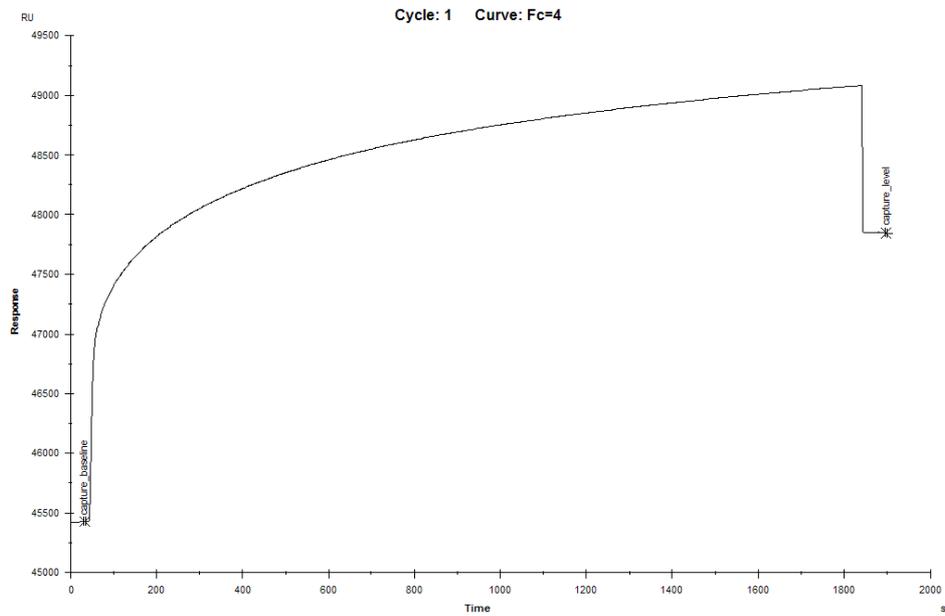


Fig. S-12-4-3 : MSP1-MsbA-14-cis のスキッチャードプロット



固定化量 : 2422.1 RU

Fig. S-12-5-1 : MSP1-MsbA-14-trans のキャプチャー

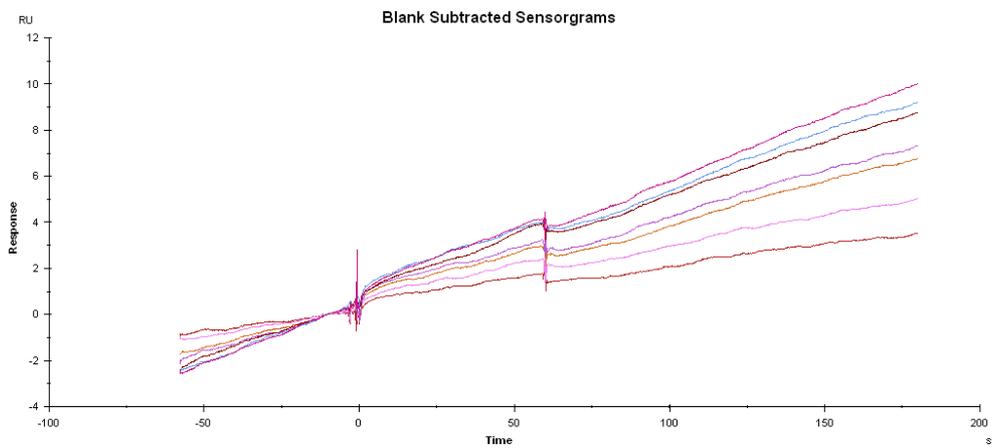


Fig. S-12-5-2 : MSP1-MsbA-14-trans のセンサグラム

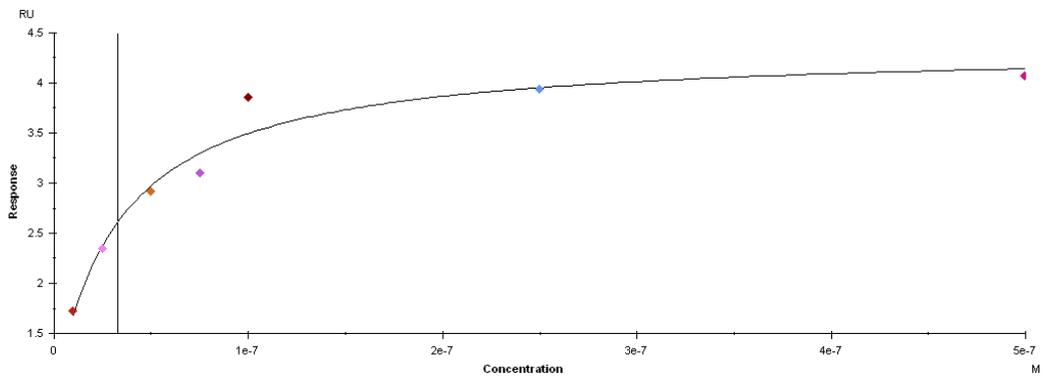
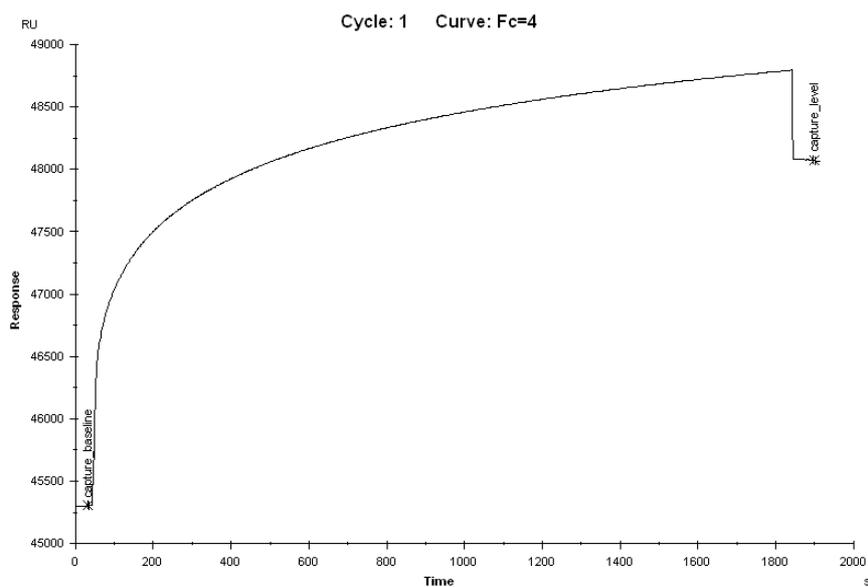


Fig. S-12-5-3 : MSP1-MsbA-14-trans のスキャッチャードプロット



固定化量 : 2767.3 RU

Fig. S-12-6-1 : E3-MsbA-DMPC のキャプチャー

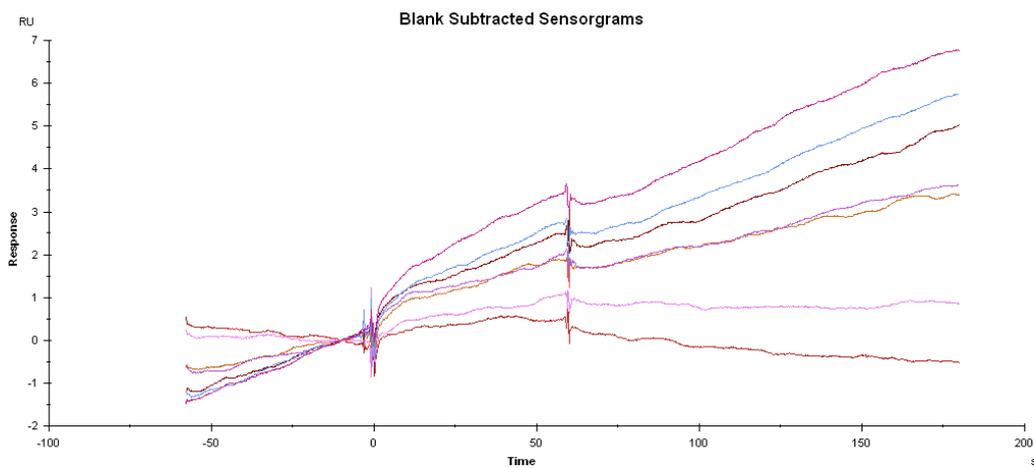


Fig. S-12-6-2 : E3-MsbA-DMPC のセンサグラム

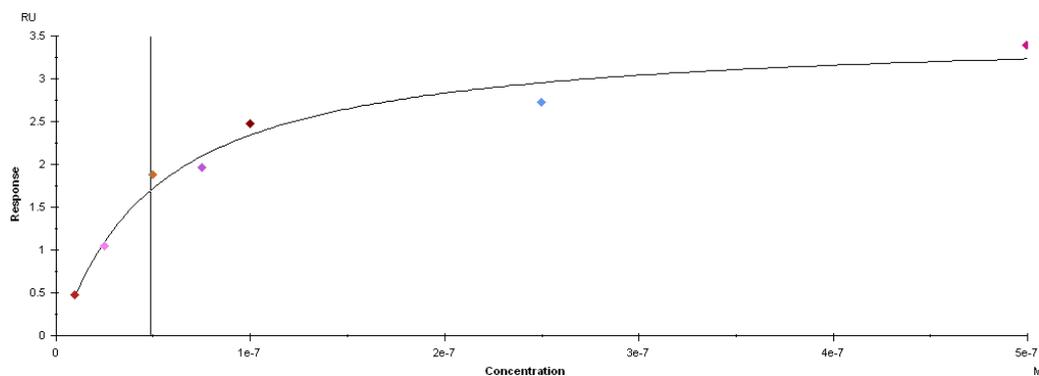
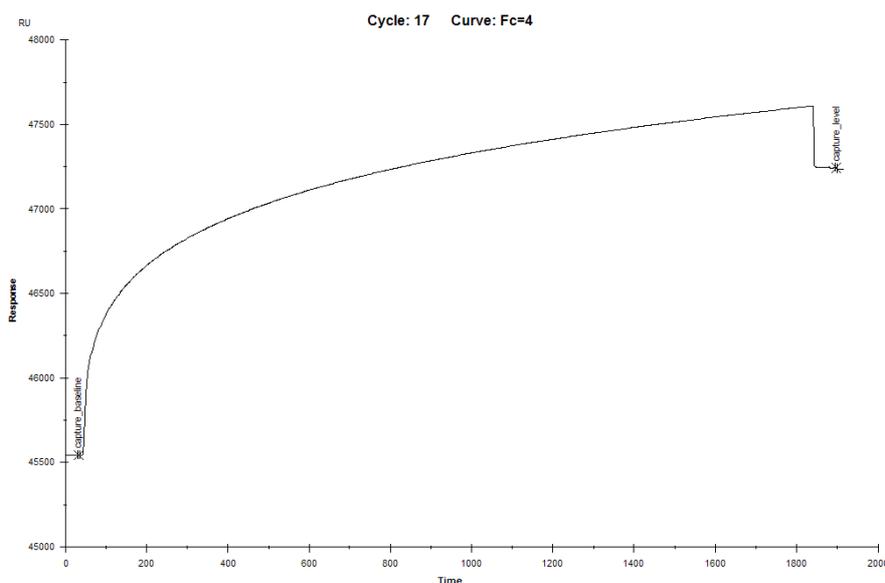


Fig. S-12-6-3 : E3-MsbA-DMPC のスキッチャードプロット



固定化量 : 1697.7 RU

Fig. S-12-7-1 : E3-MsbA-DMPG のキャプチャー

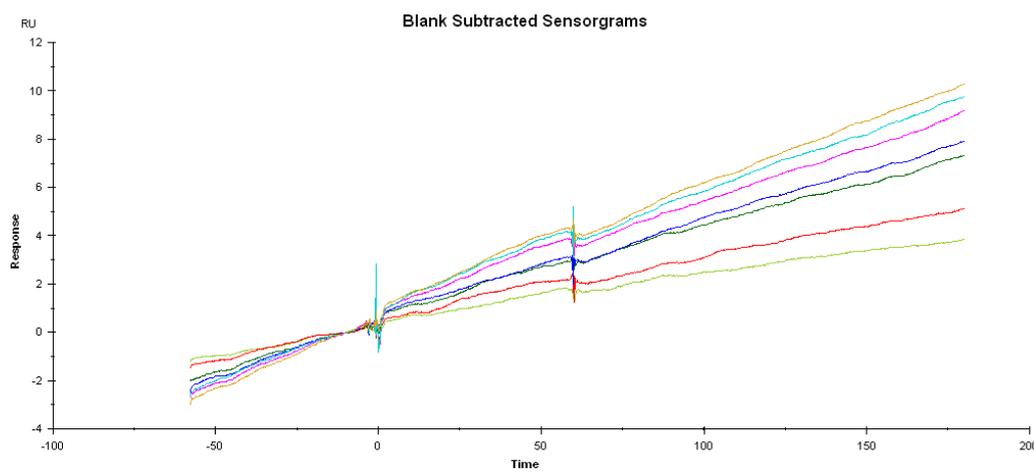


Fig. S-12-7-2 : E3-MsbA-DMPG のセンサグラム

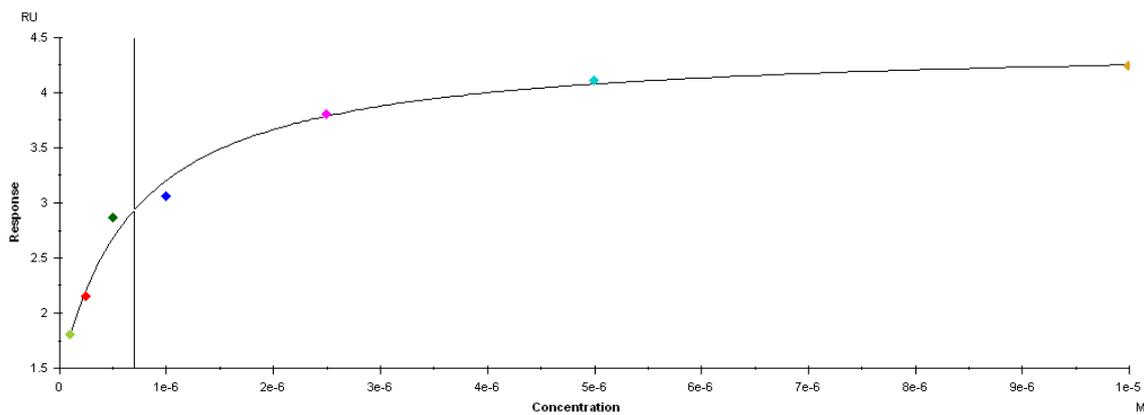
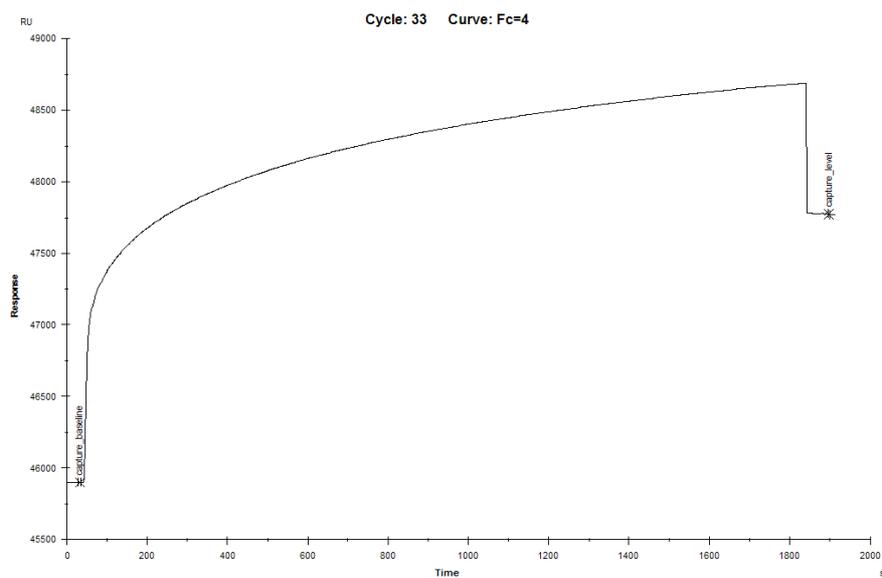


Fig. S-12-7-3 : E3-MsbA-DMPG のスキッチャードプロット



固定化量：1875.3 RU

Fig. S-12-8-1：E3-MsbA-DOPC のキャプチャー

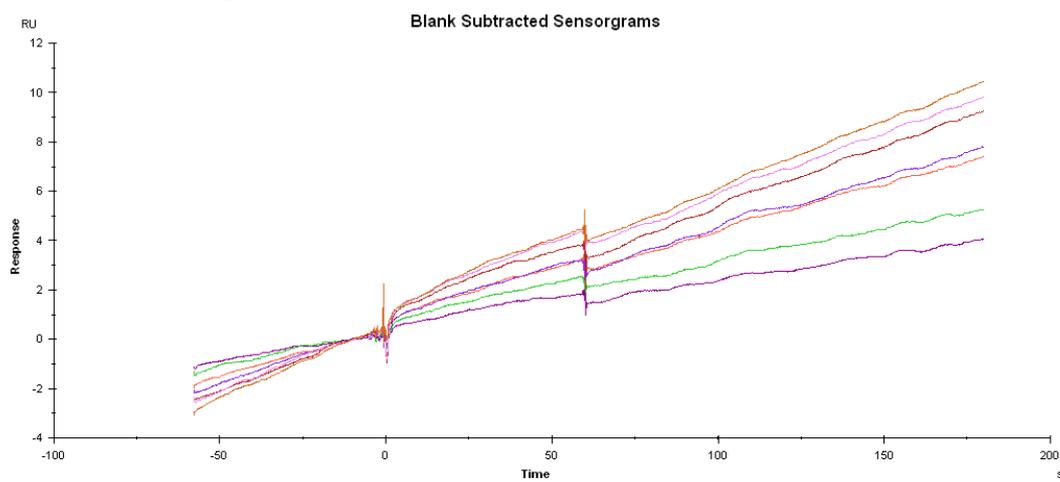


Fig. S-12-8-2：E3-MsbA-DOPC のセンサグラム

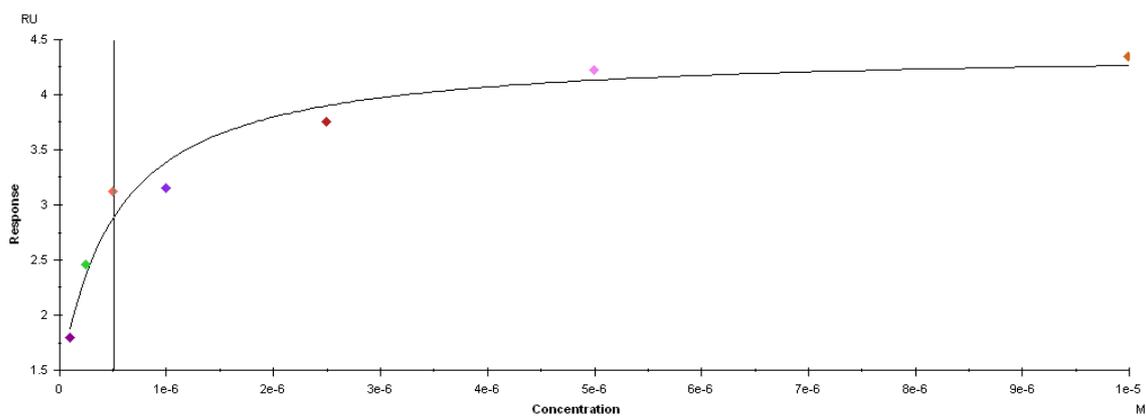
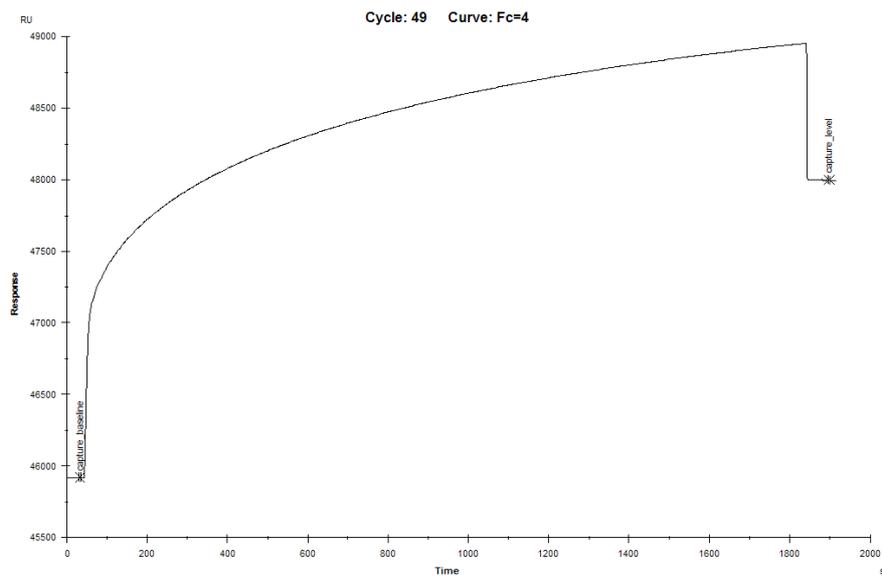


Fig. S-12-8-3：E3-MsbA-DOPC のスキッチャードプロット



固定化量 : 2078.6 RU

Fig. S-12-9-1 : E3-MsbA-DLPC のキャプチャー

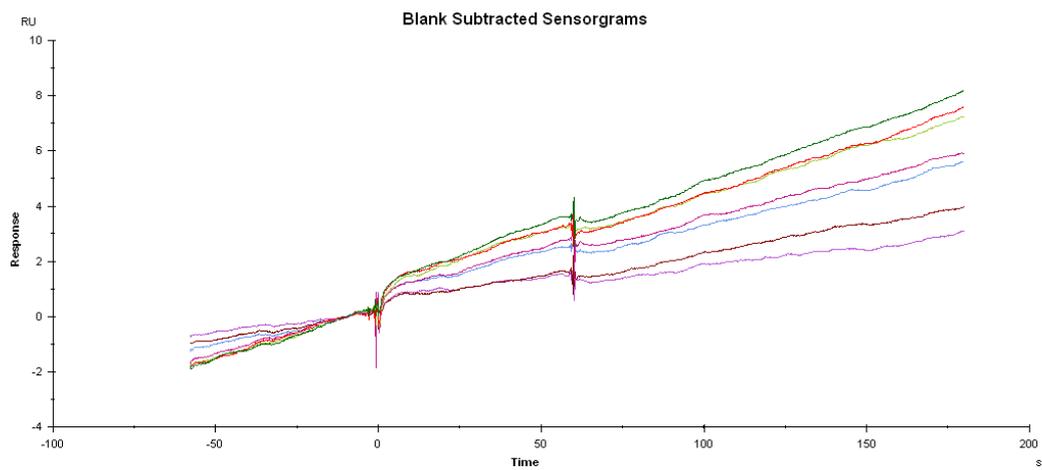


Fig. S-12-9-2 : E3-MsbA-DLPC のセンサグラム

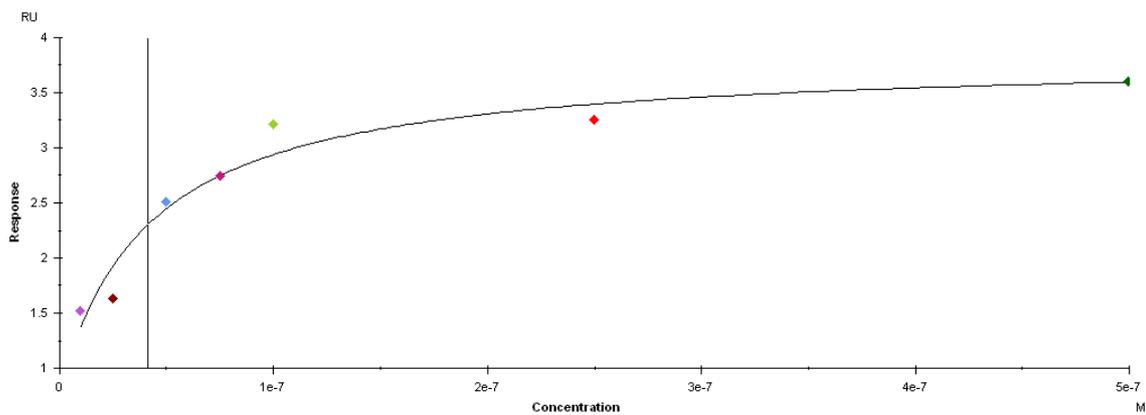
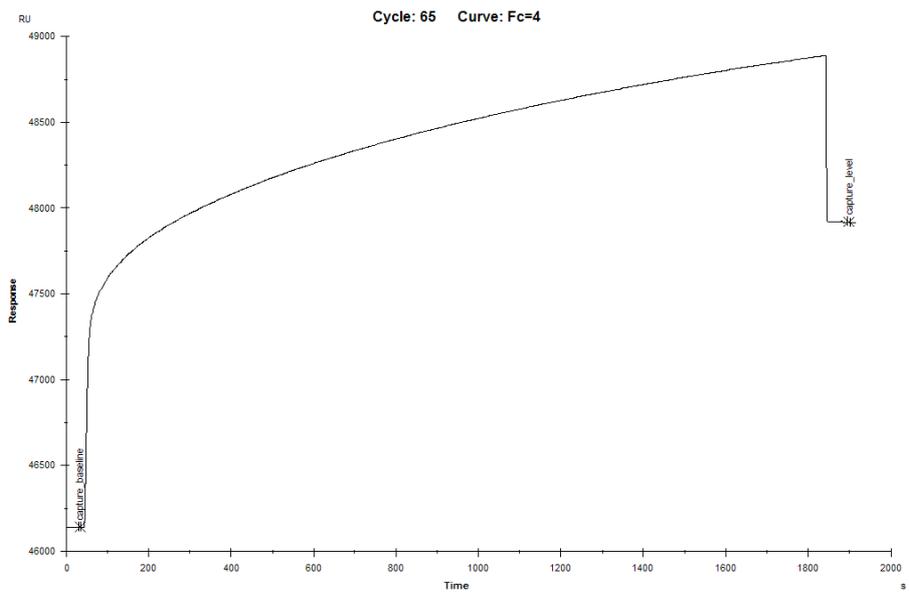


Fig. S-12-9-3 : E3-MsbA-DLPC のスキャッチャードプロット



固定化量：1776.3 RU

Fig. S-12-10-1 : E3-MsbA-14-cis のキャプチャー

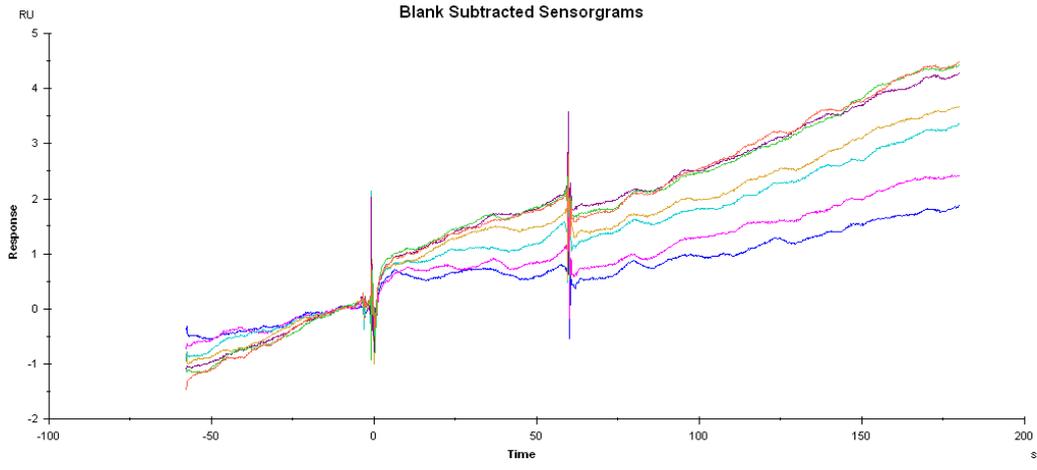


Fig. S-12-10-2 : E3-MsbA-14-cis のセンサグラム

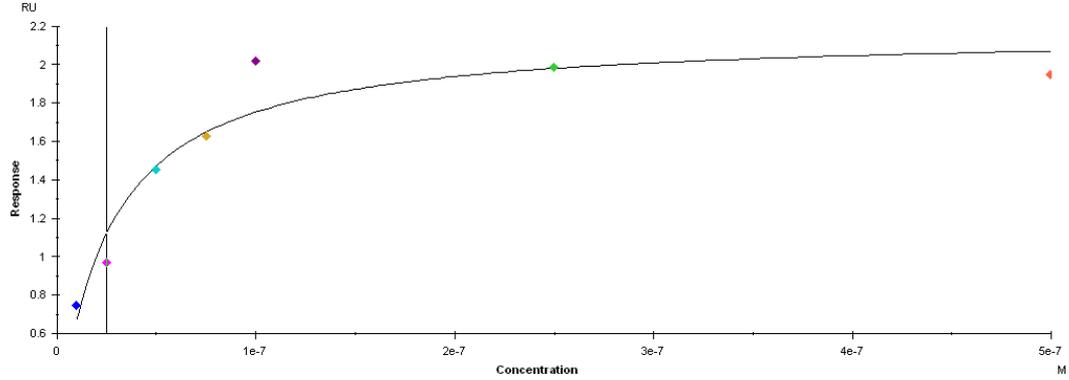
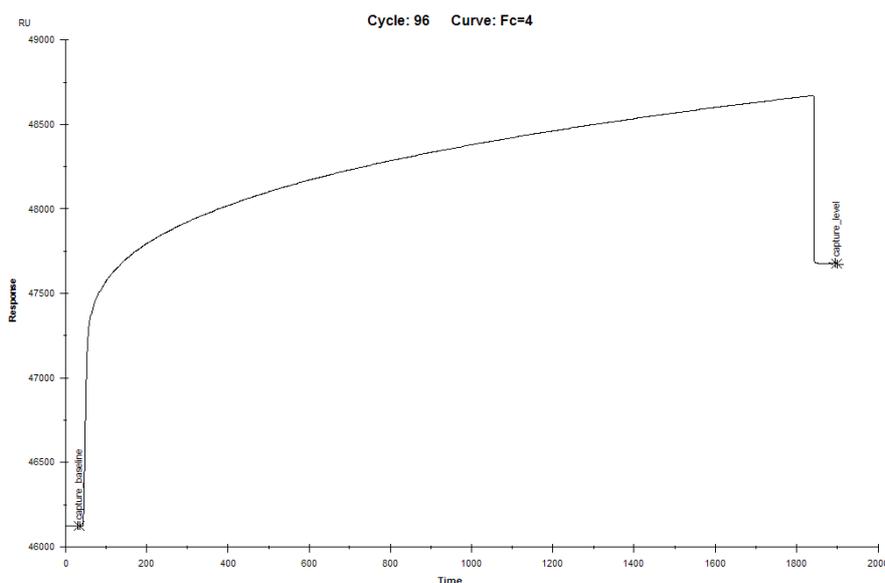


Fig. S-12-10-3 : E3-MsbA-14-cis のスキャッチャードプロット



固定化量：1553.4 RU

Fig. S-12-11-1：E3-MsbA-14-trans のキャプチャー

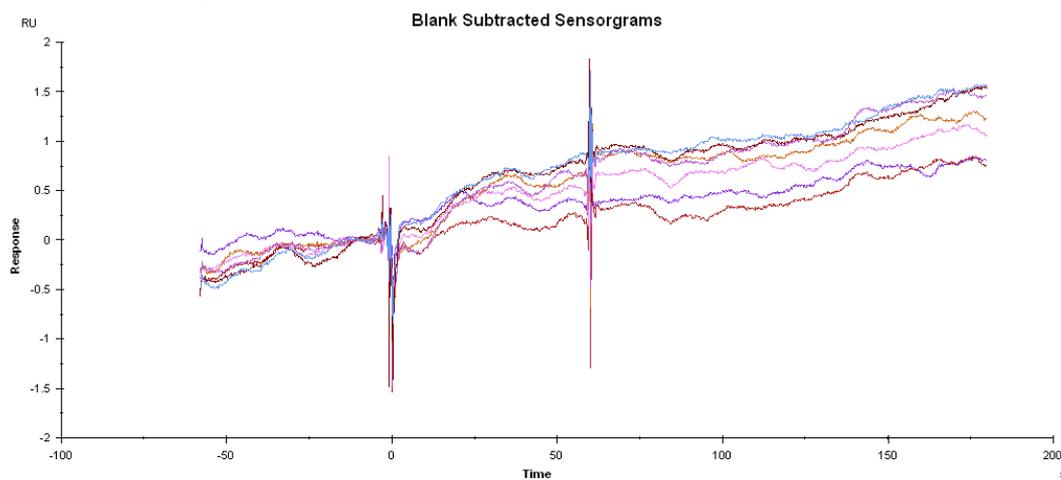


Fig. S-12-11-2：E3-MsbA-14-trans のセンサグラム

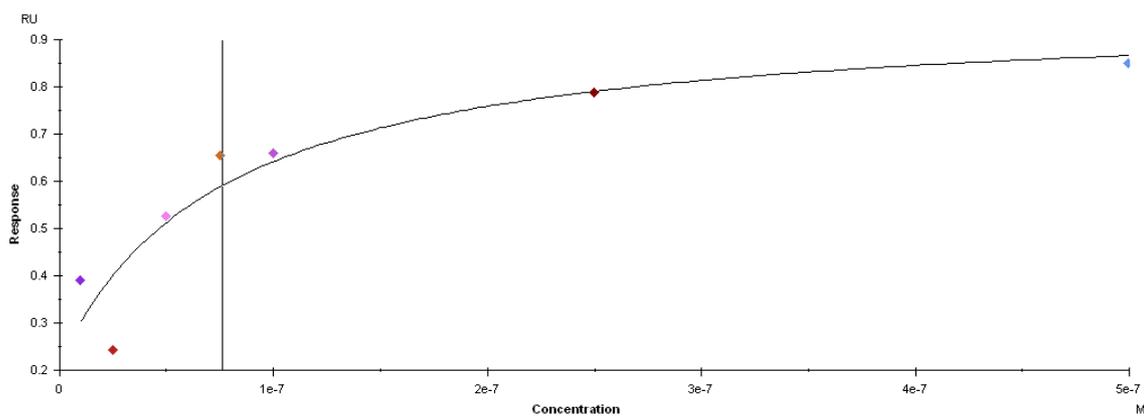


Fig. S-12-11-3：E3-MsbA-14-trans のスキッチャードプロット

S-13. MSP1AviC-MsbA における MsbA の存在比の決定

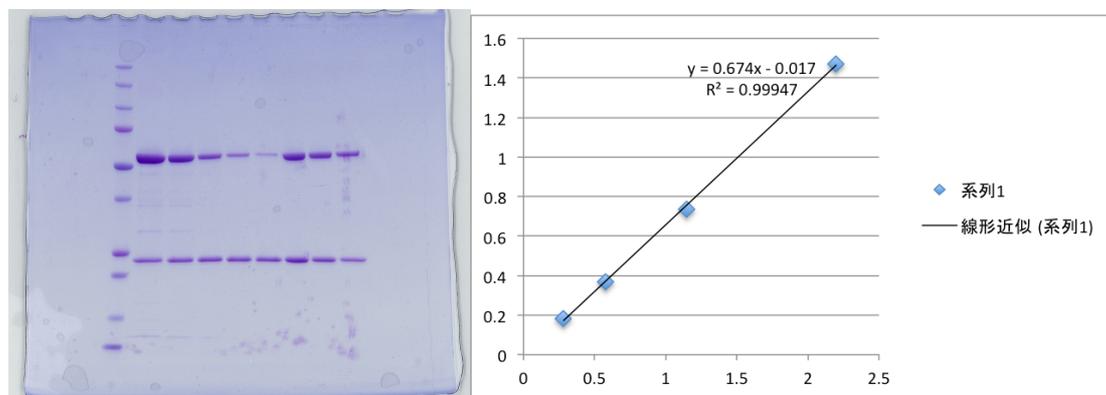


図 S-13 : MSP1AviC における MsbA の存在比の決定

参考文献

- 1 Protein Sci., 7, 4 (1998), 1029-38.
Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms.
Wallin E, von Heijne G.
- 2 Science, 287, 5460 (2000), 1960-4.
Drug discovery: a historical perspective.
J, Drews.
- 3 Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D668-72.
DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration.
Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J.
- 4 Elsevier, 2003
Membrane Protein Purification and Crystallization
Hunte, C., von Jagow, G., and Schgger, H.
- 5 Springer, 2003
Membrane protein protocols: expression, purification, and characterization
Selinsky, B. S.
- 6 Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Jan;85(3):459-70.
Silkworm expression system as a platform technology in life science.
Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, Park EY.
- 7 Methods Mol Biol. 2014;1118:267-73.
Cell-free membrane protein expression.
Kimura-Soyema T, Shirouzu M, Yokoyama S
- 8 Biochim Biophys Acta, 1666, 1-2 (2004), 105-17.
Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera.
Seddon AM, Curnow P, Booth PJ.

- 9 JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, 5, 4 (1995), 829-836.
LIPOSOMES, DIMITRI PAPAHAADJOPOULOS, AND US.
Hope, Pieter R. Cullis and Michael J.
- 10 Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9 (1980), 467-508.
COMPARATIVE PROPERTIES AND METHODS OF PREPARATION OF
LIPID VESICLES (LIPOSOMES).
Francis Szoka, Jr.
- 11 Curr Drug Deliv. 2010 Oct;7(4):283-96.
Topical dermatological drug delivery: quo vadis?
Akomeah FK.
- 12 Nano Lett, 2 (2002), 853-856.
Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane
scaffold proteins.
Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., and Sligar, S. G.
- 13 Biotechniques, 35, 3 (2003), 556-60.
Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by
incorporation into nanoscale lipid bilayers.
Civjan NR, Bayburt TH, Schuler MA, Sligar SG.
- 14 Biol Chem, 390, 8 (2009), 805-14.
The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies.
Borch J, Hamann T.
- 15 Methods Enzymol, 464 (2009), 211-31.
Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer
nanodiscs.
Ritchie TK, Grinkova YV, Bayburt TH, Denisov IG, Zolnerciks JK, Atkins WM,
Sligar SG.
- 16 FEBS Lett, 584, 9 (2010), 1721-7.
Membrane protein assembly into Nanodiscs.
Bayburt TH, Sligar SG.

- 17 FEBS Lett, 556 (2004), 260–264.
Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs.
Shaw, A. W., McLean, M. A., and Sligar, S. G.
- 18 J Am Chem Soc. , 126, 11 (2004), 3477-87.
Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size.
Denisov IG, Grinkova YV, Lazarides AA, Sligar SG.
- 19 Nat Struct Mol Biol. 2011 May;18(5):614-21. Apr 17.
Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment.
Frauenfeld J, Gumbart J, Sluis EO, Funes S, Gartmann M, Beatrix B, Mielke T, Berninghausen O, Becker T, Schulten K, Beckmann R.
- 20 Biochemistry. 2013 Dec 16.
Assembly of an Activated Rhodopsin/Transducin Complex in Nanoscale Lipid Bilayers.
D'Antona AM, Xie G, Sligar SG, Oprian DD.
- 21 J Biol Chem. 2011 Jan 14;286(2):1420-8.
Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding.
Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang CC, Tesmer JJ, Ernst OP, Sligar SG, Gurevich VV.
- 22 Nat Protoc. 2013 May;8(5):935-48.
Preparation and characterization of SNARE-containing nanodiscs and direct study of cargo release through fusion pores.
Shi L, Howan K, Shen QT, Wang YJ, Rothman JE, Pincet F.
- 23 Science. 2012 Mar 16;335(6074):1355-9.
SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open.
Shi L, Shen QT, Kiel A, Wang J, Wang HW, Melia TJ, Rothman JE, Pincet F.

- 24 *Biotechniques*. 2003 Sep;35(3):556-60, 562-3.
Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by incorporation into nanoscale lipid bilayers.
Civjan NR, Bayburt TH, Schuler MA, Sligar SG.
- 25 *J Biol Chem*, 273, 20 (1998), 12466-75.
Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis.
Zhou Z, White KA, Polissi A, Georgopoulos C, Raetz CR.
- 26 *J Biol Chem*, 277, 39 (2002), 36697-705.
ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*.
Doerrler WT, Raetz CR.
- 27 *J Biol Chem*, 279, 43 (2004), 45102-9.
MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*.
Doerrler WT, Gibbons HS, Raetz CR.
- 28 *J Biol Chem*, 279, 47 (2004), 49470-8.
MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*.
Wang X, Karbarz MJ, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CR.
- 29 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 27;104(48):19005-10.
Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist.
Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G.
- 30 *Biol Chem*. , 392, 1-2 (2011), 29-37.
Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease.
Moitra K, Dean M.
- 31 *J Biol Chem*, 278, 32 (2003), 30115-24.
A structural model for the open conformation of the *mdr1* P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure.
Seigneuret M, Garnier-Suillerot A.

- 32 *J Mol Biol.* 2009 Oct 30;393(3):574-85.
Alternating access of the putative substrate-binding chamber in the ABC transporter MsbA.
Zou P, McHaourab HS.
- 33 *J Biol Chem.* 2012 Jul 6;287(28):23923-31.
Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the nucleotide-binding domain from the ATP-binding Cassette transporter MsbA: ATP hydrolysis is the rate-limiting step in the catalytic cycle.
Syberg F, Suveyzdis Y, Kötting C, Gerwert K, Hofmann E.
- 34 *Annu Rev Phys Chem.* 2011;62:231-55.
Probing free-energy surfaces with differential scanning calorimetry.
Sanchez-Ruiz JM.
- 35 *J Mol Biol.* 2007 Sep 21;372(3):737-46.
Thermodynamic properties of BPTI variants with highly simplified amino acid sequences.
Kato A, Yamada M, Nakamura S, Kidokoro S, Kuroda Y.
- 36 *J Mol Biol.* 2008 Mar 14;377(1):117-35.
Analysis of the thermodynamics of binding of an SH3 domain to proline-rich peptides using a chimeric fusion protein.
Candel AM, van Nuland NA, Martin-Sierra FM, Martinez JC, Conejero-Lara F.
- 37 *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1838(1):69-77.
Isothermal titration calorimetry of membrane proteins - Progress and challenges.
Rajarithnam K, Rösger J.
- 38 *Anal Biochem.* 1989 May 15;179(1):131-7.
Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter.
Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN.

39 Biophys Chem. 2001 Nov 28;93(2-3):215-30.

Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions.

Cooper A, Johnson CM, Lakey JH, Nöllmann M.

40 Biochim Biophys Acta. 2013 Nov;1828(11):2763-9.

Effect of cholesterol content on the structural and dynamic membrane properties of DMPC/DSPC large unilamellar bilayers.

Soto-Arriaza MA, Olivares-Ortega C, Quina FH, Aguilar LF, Sotomayor CP.

41 Toxicol Lett. 2013 Jul 18;220(3):259-66.

Mechanisms of P-gp inhibition and effects on membrane fluidity of a new rifampicin derivative, 1,8-dibenzoyl-rifampicin.

Vilas-Boas V, Silva R, Nunes C, Reis S, Ferreira L, Vieira C, Carvalho F, Bastos Mde L, Remião F.

42 木下一彦、御橋廣眞 編 螢光測定-生物学への応用（日本分光光学測定法シリーズ（3））学術出版センター、
1983年

43 Springer

Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rdEd.

Lakowicz, J. R.

44 Biochim Biophys Acta. 1979 Dec 4;558(2):166-78.

The use of n-(9-anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers.

Thulborn KR, Tilley LM, Sawyer WH, Treloar FE.

45 J Biol Chem. 2010 May 7;285(19):14144-51.

Lipid composition regulates the orientation of transmembrane helices in HorA, an ABC multidrug transporter.

Gustot A, Smriti, Ruyschaert JM, McHaourab H, Govaerts C.

- 46 *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007;36:107-30.
Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective.
Andersen OS, Koeppe RE 2nd.
- 47 *Biochim Biophys Acta.* 2003 May 2;1612(1):1-40.
Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective.
Lee AG.
- 48 *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:177-98.
Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins.
McIntosh TJ, Simon SA.
- 49 *J Am Chem Soc.* 2009 Jun 17;131(23):8308-12.
Static and dynamic properties of phospholipid bilayer nanodiscs.
Nakano M, Fukuda M, Kudo T, Miyazaki M, Wada Y, Matsuzaki N, Endo H, Handa T
- 50 *PLoS One.* 2013 Oct 9;8(10):e75144.
High-throughput screening (HTS) and hit validation to identify small molecule inhibitors with activity against NS3/4A proteases from multiple hepatitis C virus genotypes.
Lee H, Zhu T, Patel K, Zhang YY, Truong L, Hevener KE, Gatz JL, Subramanya G, Jeong HY, Uprichard SL, Johnson ME.
- 51 *J Med Chem.* 2013 Jul 11;56(13):5514-40.
Discovery of Potent and Selective Benzothiazole Hydrazone Inhibitors of Bcl-XL.
Sleebbs BE, Kersten WJ, Kulasegaram S, Nikolakopoulos G, Hatzis E, Moss RM, Parisot JP, Yang H, Czabotar PE, Fairlie WD, Lee EF, Adams JM, Chen L, van Delft MF, Lowes KN, Wei A, Huang DC, Colman PM, Street IP, Baell JB, Watson K, Lessene G.
- 52 *FEBS Lett.* 2004 Jan 2;556(1-3):260-4.
Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs.
Shaw AW, McLean MA, Sligar SG.

- 53 *Cell Commun Signal*. 2013 Dec 13;11:94.
Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons.
Sheng L, Leshchyns'ka I, Sytnyk V.
- 54 *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec 19. pii: S0304-4165(13)00550-3.
Molecular composition and function of integrin-based collagen glues -
introducing COLINBRIs.
Zeltz C, Orgel J, Gullberg D.
- 55 *Nature*. 2006 Mar 16;440(7082):297-302.
Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.
Rothemund PW.
- 56 *Science*. 2011 Apr 15;332(6027):342-6.
DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space.
Han D, Pal S, Nangreave J, Deng Z, Liu Y, Yan H.
- 57 *Nature*. 2009 May 21;459(7245):414-8.
Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes.
Douglas SM, Dietz H, Liedl T, Högberg B, Graf F, Shih WM.
- 58 *Nat Nanotechnol*. 2011 Mar;6(3):166-9.
Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter.
Wickham SF, Endo M, Katsuda Y, Hidaka K, Bath J, Sugiyama H, Turberfield
AJ.
- 59 *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Dec 3;49(49):9378-83.
Orthogonal protein decoration of DNA origami.
Saccà B, Meyer R, Erkelenz M, Kiko K, Arndt A, Schroeder H, Rabe KS,
Niemeyer CM.
- 60 *J Am Chem Soc*. 2010 Mar 17;132(10):3248-9.
Gold nanoparticle self-similar chain structure organized by DNA origami.
Ding B, Deng Z, Yan H, Cabrini S, Zuckermann RN, Bokor J.
- 61 *Anal Biochem*. 2007 Feb 1;361(1):1-6.
Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis.
Rich RL, Myszka DG.

- 62 *Anal Biochem.* 2006 Dec 1;359(1):112-9.
High-resolution characterization of antibody fragment/antigen interactions using Biacore T100.
Papalia GA, Baer M, Luehrsen K, Nordin H, Flynn P, Myszka DG.
- 63 *Protein Expr Purif.* 2012 Mar;82(1):162-7.
Expression and purification of *E. coli* BirA biotin ligase for in vitro biotinylation.
Li Y, Sousa R.
- 64 *Plant Physiol.* 1990 Nov;94(3):882-6.
An H-ATPase Assay: Proton Pumping and ATPase Activity Determined Simultaneously in the Same Sample.
Palmgren MG.
- 65 *J Lipid Res.* 2008 Jul;49(7):1420-30
Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations.
Blanchette CD, Law R, Benner WH, Pesavento JB, Cappuccio JA, Walsworth V, Kuhn EA, Corzett M, Chromy BA, Segelke BW, Coleman MA, Bench G, Hoelrich PD, Sulchek TA.
- 66 *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012 May 14;51(20):4864-7.
DNA origami gatekeepers for solid-state nanopores.
Wei R, Martin TG, Rant U, Dietz H.

謝辞

はじめに、本研究を遂行するにあたって大変興味深い研究題材と大変素晴らしい研究環境を提供してくださり、非常に熱意のある指導をしていただいた私の指導教官である本学新領域創成科学研究科 上田 卓也 教授に深く感謝の意を申し上げます。

私が所属する研究室である分子医科学分野の准教授である 富田 野乃 准教授には研究室内のセミナーなどで大変ありがたいご助言を賜りましたことを深く御礼申し上げます。

私が修士課程の時に師事した本学工学系研究科 津本 浩平 教授には研究室を離れた後も気兼ねなく研究の相談に応じてくれたこと、また研究機材を利用させて頂き誠にありがとうございました。

本論文を執筆するにあたり大変貴重な御助言を賜りました、本学新領域創成科学研究科 山本 一夫 教授、本田 真也 客員教授に深く感謝し御礼申し上げます。

また、アニソトロピーの実験を行うにあたって研究機材を貸していただいた本学薬学系研究科 船津 高志 教授、また、装置の使用法をご指導していただいた 上野 太郎 博士に深く御礼申し上げます。

共同研究を御承諾して頂き、貴重な遺伝子試料を御提供いただいた徳島大学疾患ゲノムセンター 片桐 豊雅 教授に深く感謝申し上げます。

膜蛋白質の基礎から実験手法、研究に対する態度、はたまた海外での刺激ある生活を大変熱心に御教授いただいた本学工学系研究科 Jose Manuel Martinez Caaveiro 特任助教に深く御礼申し上げます。

熱力学的解析の結果の解釈には本学工学系研究科の助教である 長門石 暁 博士には大変お世話になりました、深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ITC の装置を私の代わりに測定していただいた本学新領域創成科学研究科 湯村 恭平 博士には深く感謝しています、どうもありがとうございました。

私の所属する研究室の助教であり、私の作成する書類や実験などで大変お世話になった 多田隈 尚史 博士には言葉にならないくらいの感謝の気持ちでいっぱいですが、本当にありがとうございました。

私の研究に関する大変有意義な討論を行ってくれ、味のある研究室生活を私に過ごさせてくれた当研究室の諸先輩方並びに諸後輩方に心より感謝申し上げます。研究における皆様の真摯な態度に私も多分に影響を受け、本研究を遂行することが出来ました。

研究に対する愚痴を言い合ったり、励まし合ったり、私の心を癒してくれた同期の赤羽 しおり 博士に心から感謝申し上げます。

また、博士課程 3 年までの大学生活 9 年間を通じていついかなる時も私を受け入れてくれた菊里高校や工学部化学生命工学科の同級生一同に大いなる感謝を申し上げます。

私の研究における息抜きであるサッカーに付き合っていたいただいたサッカー仲間の皆様、誠にありがとうございました。また、研究で荒んだ私の心を癒してくれた艦隊これくしょんの開発スタッフの皆様のおかげで健やかな気持ちで研究を行う事が出来ました、どうもありがとうございました。

この年齢まで働かず研究活動を行うことを許してくれ、また、支えてくれた家族に感謝いたします、ありがとうございました。

出会って以来常に私の心の中心にいてくれ、いついかなる時でも私を励ましてくれた最愛の人 古河 渚に全身全霊をもって感謝申し上げます。

最後に、この研究生生活の 6 年間どのような過酷な環境化でも耐え抜いて研究をやり遂げた我が精神と肉体に最大級の感謝の意を表す。

2014 年 3 月

河合武揚