

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 河合武揚

[背景・目的]

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。しかし、その生化学的活性の定量的評価や物理化学的な評価には限界があった。これは、安定かつ均一な膜蛋白質試料の調製とその評価が難しかったためである。生体内で膜蛋白質は脂質二重膜中に存在しているため、水溶液中では疎水性残基が露出してしまい凝集しやすくなる。この膜蛋白質の凝集を避けるため、従来は界面活性剤やリポソームなどが用いられてきたが、それぞれに欠点がある。例えば、界面活性剤は細胞膜の構成成分であるリン脂質とは物性が異なっているため膜蛋白質の機能を損なうおそれがあり、膜蛋白質の安定性に難があった。また、リポソームでは内向き・外向きといった膜蛋白質の配向性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分子数を制御することが困難であり均一な試料作成に難があった。さらに、膜蛋白質の機能には膜の流動性が大きな影響を与える可能性が考えられるが(1)、リポソームの大きさをナノメートル精度で制御しながら作成することは困難であり、流動性の影響を詳細に解析することは難しかった。

本研究では、ナノディスクを用いた実験系を構築した。ナノディスクは MSP(membrane scaffolding protein) と呼ばれるベルト状の蛋白質と脂質との複合体であり(図 1)、形状が円盤型で内側と外側の区別がないためリポソームを用いた時に問題となった膜蛋白質の配向が存在しない。また、大きさが膜蛋白質の単量体や二量体程度であることから、包摂される分子数を単量体や二量体等に限定することができる。さらに、MSP の種類を変えることによってナノディスクの大きさをナノメートル単位で厳密に制御することが可能であり、分子数や流動性の影響を詳細に解析する際に威力を発揮することが期待できる。そのため、界面活性剤やリポソームを用いる場合と比較して、より安定で均一な実験系の構築が可能である(2,3)。しかし、従来の研究ではナノディスクの大きさが膜蛋白質の活性にどのように影響を与えるのかは定かではなかった。

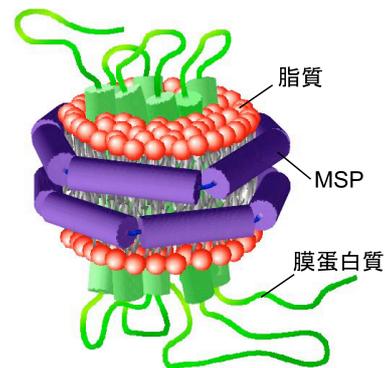


図 1: ナノディスク

本研究では ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター(ATP 加水分解酵素)である MsbA(4) をモデル膜蛋白質として、5 つの大きさのナノディスク(直径 11~13 nm)を用い、MsbA の生化学的、物理化学的性質を定量的に評価した。

[方法・結果]

MsbA の生化学的解析

MsbA を飽和脂質である **1, 2 - dimyristoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine (DMPC)** と 5 種類の大きさの MSP を用いてナノディスクへ包摂したところ、サイズ排除クロマトグラフィーによりほぼ対称的なピークが得られ、約 11~13nm の大きさのナノディスクを取得することに成功した(図 2)。得られた分子種に関して ATP 加水分解活性を測定したところナノディスクを用いた方が界面活性剤である DDM を用いた場合よりも最大で 8.8 倍比活性は高かった(図 3)。さらに、加水分解活性はナノディスクのサイズが小さくなるにつれて上昇した(図 3)。次に、ATP 加水分解活性の違いの原因を探るため、酵素速度論解析を行った。酵素の触媒能を示す k_{cat} / K_M はほとんど変わらなかったものの k_{cat} 、 K_M とともにナノディスクのサイズが小さい物の方が大きかった(図 4、表 1)。これはサイズの小さいナノディスクの方が加水分解の速度は大きいが基質結合はサイズの大きいナノディスクの方が有利であることを示している。

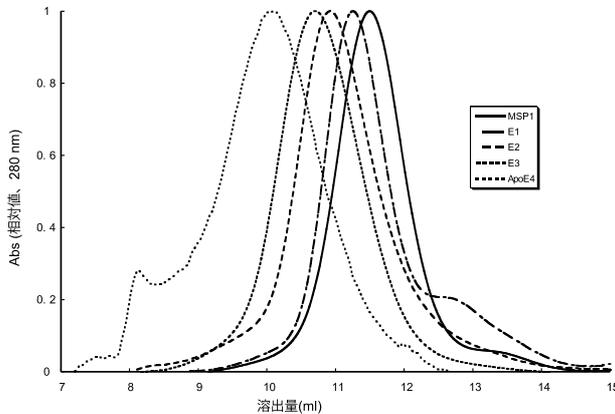


図 2: MsbA のサイズ排除クロマトグラフィー

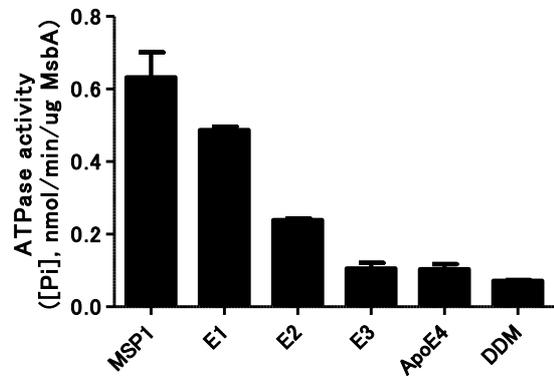


図 3: MsbA の活性

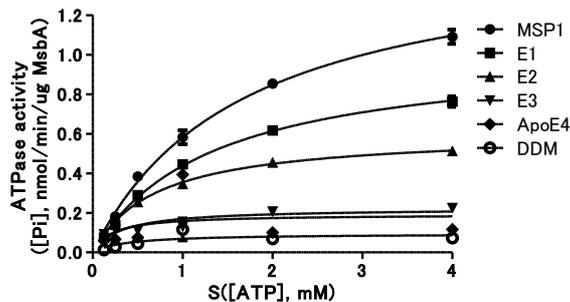


図 4: MsbA の酵素速度論解析

表 1: MsbA の酵素速度論定数

	MSP1	E1	E2	E3	ApoE4	DDM
大きさ(nm)	11.3	11.5	12.0	12.3	13.0	-
Vmax (nmol / min / μg MsbA)	1.55	1.03	0.606	0.223	0.192	0.0942
k_{cat} (min ⁻¹)	100	66	39.1	14.4	13.4	6.08
K_M (mM)	1.67	1.34	0.708	0.317	0.211	0.375
k_{cat} / K_M	59.9	49.3	55.2	45.4	63.5	16.2

MsbA の物理化学的解析

MsbA の熱安定性を示差走査熱量計によって解析を行ったところ、界面活性剤である DDM を用いた場合よりも 9.9°C 向上しており、ナノディスクのサイズが小さくなるにつれて熱安定性は上昇することがわかった(図 5)。次に、等温滴定型熱量計によって ATP との相互作用を ATP アナログである AMP-PNP を用いて測定した。その結果ナノディスクのサイズが小さくなるにつれてエンタルピーの寄与は減少し、一方でエントロピーは増大した(表 2)。これはサイズの小さいナノディスクの方が AMP-PNP との結合に伴う熱的变化は不利になるが、構造変化に伴うエントロピー損が減少していることを示唆している。さらに、MsbA を包摂したナノディスクにおける膜の流動性を評価するために、蛍光脂質を用いた偏光測定によりアニソトロピーを測定した。その結果サイズの小さいナノディスクの方がアニソトロピー値は上昇した。すなわち膜の流動性は低下することが確認された(図 6)。

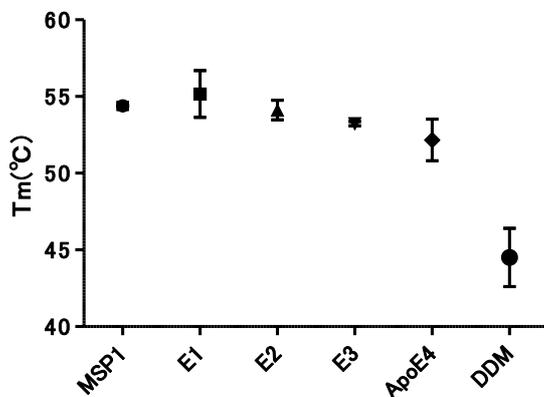


図 5: MsbA の変性温度

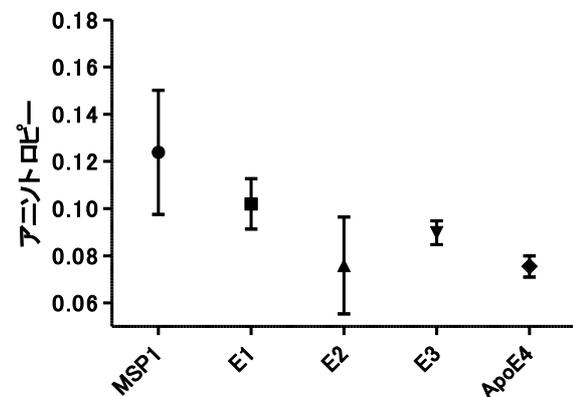


図 6: MsbA のアニソトロピー

表 2: MsbA の熱力学的定数

	MSP1	E1	E2	E3	ApoE4	DDM
$K_A (\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	8.12	5.11	4.36	3.26	n.d.	n.d.
ΔH (kcal / mol)	-25.4	-29.6	-35.8	-45.1	n.d.	n.d.
ΔS (cal / mol / K)	-58.2	-73	-94.2	-126	n.d.	n.d.
ΔG (kcal / mol)	-8.1	-7.8	-7.7	-7.6	n.d.	n.d.

[考察・今後の予定]

本研究ではナノディスクを用いることで従来困難であった膜蛋白質の生化学的活性の定量的評価を試みた。定量的評価の際は均一な試料の取得が肝要であるが、本研究では純度の高い MSP の使用や、ナノディスク作成法を工夫することで均一試料の調整に成功しサイズ排除クロマトグラフィーで確認した。この均一な試料を用いて ABC トランスポーター MsbA の ATP 加水分解活性や熱安定を測定したところ界面活性剤 DDM で調整した MsbA と比較して活性(最大で 8.8 倍)や熱安定性(+9.9°C)が向上していた。このことは膜蛋白質をナノディスクに包摂することでより安定で均一な試料を得られることを示している。

続いて、ナノディスクの大きさを変え、より詳細な生化学的、物理化学的測

定を行った。従来の膜蛋白質を測定する際に用いられていた界面活性剤やリポソームでは均一な試料を得るのに難点があることに加え分子密度制御が難しかったが、ナノディスクではベルト蛋白質 MSP によってサイズが厳密に規定されているので従来は困難であった物理化学的性質の詳細な測定が可能となった。直径が 11~13nm の 5 種類のナノディスクを用いて測定を行ったところ、熱安定性はサイズの小さいナノディスクの方が高く、膜の流動性は低かった。これは、サイズの小さいナノディスクにおいては膜の流動性が低下したことにより MsbA の二次構造が安定化されたことを示唆している。また、サイズの小さいナノディスクの方が MsbA の ATP 加水分解における k_{cat} 、 K_M は大きく、膜の流動性は小さかった。これらの結果は膜の流動性が膜蛋白質の構造に影響を与え、その結果生化学的活性にも影響を与えると仮定すると、上手く説明することができる。ABC トランスポーターの一種である HorA では、脂質組成を変え、膜の性質を変えると、膜貫通領域の開きの角度が変わり加水分解活性に影響を与えると報告されている(5)。その際は、膜貫通領域の開きの角度が小さい、すなわち構造変化の小さいもののほうが加水分解活性は高かった。今回の測定では、小さなナノディスクを用いて、膜流動性が低い方が加水分解活性が高いという結果を得られた。これは HorA と同様に、構造変化の小ささが加水分解活性に有利にはたっている可能性が考えられる。膜流動性が小さい際に構造変化が小さいことは、今回ナノディスクを用いることで初めて測定が可能となった熱力学的定数の測定からも支持された。サイズの小さいナノディスクでは、AMP-PNP 結合時のエンタルピー得は小さく、すなわち結合によって獲得される熱量は小さくなっており、一方、エントロピー得は大きく、すなわち結合によって誘起される構造変化は小さくなっていった(図 7)。これらの結果は、膜の流動性と生化学的活性の相関を示唆しており、ナノディスクを用いて作成した均一な試料が、詳細な定量に有効であることを示している。さらに、ナノディスクの大きさを変化させ流動性の制御を行うことのみならず脂質組成を変化させることで高活性の膜蛋白質を調整できる可能性を示している。

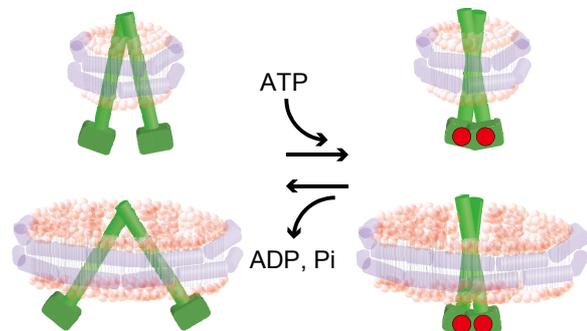


図 7：ATP 結合に伴う構造変化のモデル

このようにナノディスクは膜蛋白質を安定に均一化することが可能で、使用する MSP を変えることで容易に膜流動性の制御を行うことが出来る。ナノディスクを用いれば従来の技術よりも精緻な解析が可能となるので膜蛋白質の生化学的、物理化学的解析に有用な技術である。

今後は流動性の異なる脂質を用いて同様の実験やストップフロー法を用いて結合の速度論的解析を行い膜の流動性と生化学的活性の相関のさらなる理解を深めたいと考えている。

[引用文献]

- (1) : *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007 June;36:107-30. Anderson OG et al.
- (2) : *J Am Chem Soc.* 2004 Mar 24;126(11):3477-87. ; Denisov IG et al.
- (3) : *Biotechniques.* 2006 May;40(5):601-2, 604, 606, passim. , Leitz AJ et al.
- (4) : *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36697-705. Epub 2002 Jul 15. ; Doerrler WT et al.
- (5) : *J Biol Chem.* 2010 May 7;285(19):14144-51 ; Gustot A et al