

膜タンパク質結晶化への利用を目指した脂質立方相の光誘起相転移の研究 Light-induced phase transition of lipid cubic phase for the use of membrane protein crystallization

栗田晋吾¹, 伊平 寛¹, 奥津哲夫¹, 高橋 浩^{2*}

¹群馬大学大学院理工学府 分子科学部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

²群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

Shingo Kurita¹, Hiroshi Ihira¹, Tetsuo Okutsu¹, Hiroshi Takahashi^{2*}

¹ Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology,
Gunma University, 1-5-1 Tenjin, Kiryu, 376-8515, Japan

² Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology,
Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, 371-8510, Japan

1 はじめに

放射光源の高輝度化、高性能検出器の開発により微小なタンパク質結晶でも構造解析が可能となり、構造生物学は著しく発展した。しかしながら、主要な生体機能の多くを担う膜タンパク質に関する構造生物学は、それほど活発ではない。発展を妨げている最大のものは、膜タンパク質の結晶化の難しさである。

膜タンパク質の結晶化の方法として、脂質立方相を利用するものが注目されている[1]。これは、まず立方相の構造を取っている脂質二重層に膜タンパク質を再構成し、その後、立方相がラメラ相 (L_{α} 相) に相転移させ、膜タンパク質の結晶化を促す方法である[1]。一般に、この相転移の誘起には、塩の脱水効果が利用されている。

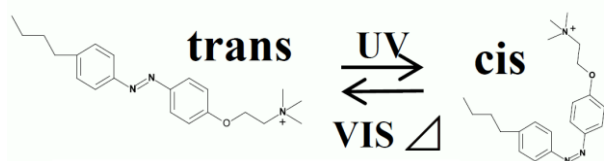


図 1 : AZTMA の光異性化反応。

我々は、この脂質立方相を使う膜タンパク質の結晶化の効率化を目指し、分子形状が光化学反応で変化する界面活性剤を、脂質立方相に加えて、光照射を使って脂質の相を制御できないか検討してきている。利用した界面活性剤は、図 1 および図 2 に、化学構造を示した 4-Butylazobenzene-4'-(oxyethyl)trimethylammonium bromide (AZTMA) で、この分子は、紫外(UV)線を照射すると二重結合部位が、trans から cis に変化し、可視光照射で元に戻る[2]。さらに、AZTMA のアルキル鎖の長さの異なる、他の 3 つの界面活性剤も用意した。これらの

AZTMA 系界面活性剤を脂質モノオレインの立方相に加えた系の構造を調べるとともに、光照射が立方相構造からラメラ構造への転移を引き起こすかを明らかにするのが、本研究の目的である。

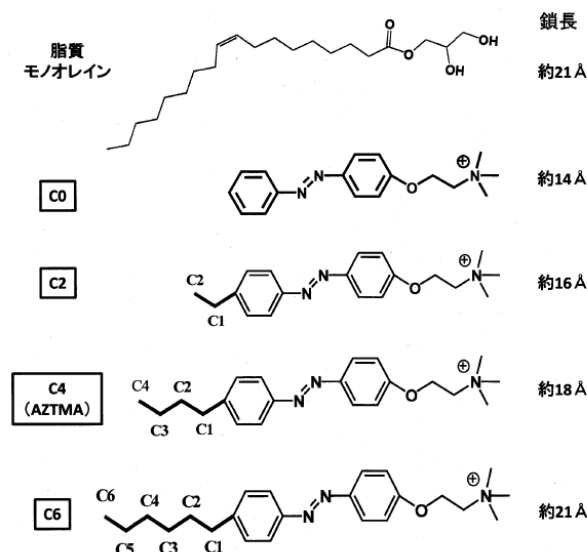


図 2 : 本研究で使用した物質の化学式。

2 実験

アルキル鎖の長さの異なる 4 種の光異性化界面活性剤 (図 2)、4-(Trimethylammonioethoxy)azobenzenebromide (C0)、4-ethylazobenzene-4'-(oxyethyl)trimethylammonium bromide (C2)、4-butylazobenzene-4'-(oxyethyl)trimethylammonium bromide (C4, AZTMA)、4-hexylazobenzene-4'-(oxyethyl)trimethylammonium bromide (C6) は、文献[3,4]の方法を参考に合成した。

AZTMA 系界面活性剤含有水溶液をモノオレインの粉末に加えて、自作のシリンジミキサーにより機

械的な攪拌により混合する方法でサンプルを作製した。加えた AZTMA 系界面活性剤の濃度はモノオレインに対して 7mol% の割合とした。

サンプルの光異性化反応を起こさせる照射は、300W キセノンショートアークランプ (USHIO, UXL-300D) に、バンドパスフィルターを組み合わせるものを光源として行った。

偏光観察は、実体顕微鏡 (Olympus, SZX9) に偏光フィルター (Olympus, SZX-AN) を組み合わせてクロスニコル条件で行った。

X 線回折測定は放射光科学研究施設 (Photon Factory; PF) の BL-6A で行われた。X 線検出器には、X 線光子計数型 2 次元検出器 PILATUS 100K、ならびに、1 M (Dectris, スイス) を使用した。カメラ長(約 1000 mm)は、ベヘン酸銀の回折データから決定した。露光時間は 60 秒であった。

3 結果および考察

AZTMA(C4)・モノオレイン系では、UV 照射前、クロスニコル条件で観察すると光を通さない暗い偏光顕微鏡画像が、UV 照射によって AZTMA を trans 体から cis 体に光異性化させると、偏光が解消し、光が透過する明るい画像となった。このサンプルに可視光を照射し、AZTMA を再び trans 体に戻すと、元の暗い像に戻った。偏光を示さない状態は、系が等方的であり、立方相構造を取っていることを示唆し、偏光を示す明るい像は、AZTMA 系界面活性剤・モノオレイン混合系が、ラメラ構造を取ったことを示唆すると考えられる。

アルキル鎖長を変えた系の実験において、C0 系では、UV 照射は偏光に何らの影響も与えなかった。C2 系では UV 照射は、C4 の AZTMA と比較すると少ない光透過量の増加しか観察されなかった。これは C2 系では、相転移が起きにくいためと考えられる。C6 系では、UV 照射の有無にかかわらず最初から光透過が認められ、C6 の構造が trans 体、cis 体にかかわらず常にラメラ構造を取っているものと推測された。

偏光観察の結果をまとめると、次のようになる。アルキル鎖が短いと UV 照射によって光異性化が起こっても系全体の相構造を変化させるには至らない。一方、アルキル鎖が長すぎるのも好ましくなく、C6 系では相構造の変化は起こっていないと推定される結果となった。光異性化反応をきっかけとして相構造を起こすには、AZTMA 系界面活性剤が 7mol% の濃度では、C4 程度アルキル鎖長が最適であるといえる。

偏光観察によるものは推定であり、正確な構造は X 線回折によって決定する必要がある。その結果は、C0, C2, C4 系においては、偏光観察から推定された通りの構造変化が認められた。すなわち、C0, C2 の両系においては、UV 照射の有無にかかわらず、Ia3d の空間群を持つ立方相の構造であった。ただ、C0 系では格子定数を含め全くの変化が、照射の

前後で認められなかったが、C2 系では、UV 照射後の系で格子定数の減少が認められた。C4 である AZTMA でも、偏光観察の予測通りで、UV 照射前は Ia3d の立方相の構造であったものが、照射後、繰り返し周期が 4.7nm のラメラ構造へ転移したことが X 線回折から確認できた。

しかしながら、C6 系においては、現時点で偏光観察と X 線回折の結果が一致しない状況となっている。偏光観察からはラメラ構造と UV 照射前の状態で、C6 系のサンプルは Ia3d の立方相構造を示した (図 3)。UV 照射後では、図 3 に示したように、Ia3d の立方相構造の回折ピークに加えて、強度としては弱い、約 5.2nm の繰り返し周期を持つラメラ構造に由来するピークが出現した (図 3 の矢印で示したピーク)。UV 照射後、立方相の方の格子定数が減少することは、C2 系と同様であった。

偏光観察と X 線回折の結果の不一致の理由は不明であるが、両実験において、照射を全く同一な条件で実験することが実現できていないため、その点に関しては改善の必要がある。

いずれにせよ、AZTMA 系界面活性剤・モノオレイン混合系の光異性化反応による構造変化は、AZTMA 系界面活性剤のアルキル鎖の長さに依存することが明らかとなった。

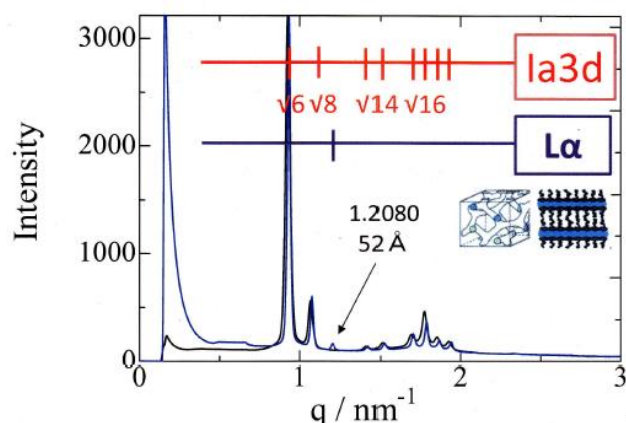


図 3 : モノオレイン/C6 系の回折像。黒線 : UV 照射前。青線 : UV 照射後。照射前の構造は、そのピーク位置 (図の上の赤い線) の比から Ia3d の空間群を持つ立方相であることが分かる。照射後、弱いながら矢印で示したラメラ構造に由来すると思われるピークが出現した。

参考文献

- [1] G. Rummel *et al.*, *J. Struct. Biol.* **121** 82 (1998).
- [2] A. Matsumura *et al.*, *Langmuir* **27** 1610 (2010).
- [3] J. Ruchmann *et al.*, *Macromolecules* **44** 604 (2011).
- [4] T. Hayashita *et al.*, *Colloid Polym. Sci.* **272** 1611 (1994).