

部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC 膜に再構成した膜タンパク質バクテリオロドプシンの 2 次元格子の安定性

Stability of the two-dimensional lattice of bacteriorhodopsin reconstituted in partially fluorinated phosphatidylcholine (F4-DMPC) bilayers

高橋 浩^{1,*}, 吉野 賢², 森田康平², 高木俊之³, 横山泰範⁴, 菊川峰志^{5,6}, 網井秀樹²,
金森敏幸³, 園山正史^{2,7,8}

¹ 群馬大学理工学府 理工学基盤部門 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

² 群馬大学理工学府 分子科学部門 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

³ 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 〒305-8568 つくば市東 1-1-1

⁴ 名古屋大学工学研究科 応用物理学専攻 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

⁵ 北海道大学生命科学院 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

⁶ 北海道大学国際連携研究教育局 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

⁷ 群馬大学食健康学教育研究センター 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

⁸ 群馬大学未来先端研究機構 〒371-8515 前橋市昭和町 3-39-22

Hiroshi Takahashi^{1,*}, Masaru Yoshino², Kohei Morita², Toshiyuki Takagi³, Yasunori Yokoyama⁴,
Takashi Kikukawa^{5,6}, Hideki Amii², Toshiyuki Kanamori³, Masashi Sonoyama^{2,7,8}

¹Division of Pure and Applied Science, Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, 371-8510, Japan

²Division of Molecular Science, Gunma University, 1-5-1, Tenjin, Kiryu, 376-8515, Japan

³National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, 305-8568, Japan

⁴Department of Applied Physics, Nagoya University, Nagoya 464-8603, Japan

⁵Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan

⁶Global Station for Soft Matter, GI-CoRE, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan

⁷Gunma University Center for Food Science and Wellness (GUCFW), Maebashi, 371-8510, Japan

⁸Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR), Maebashi, 371-8511, Japan.

1 はじめに

フッ素は、電気陰性度が最大の元素で、炭素-フッ素 (C-F) 結合は、熱的、化学的に極めて安定である。炭化フッ素系の物質は、撥水性とともに撥油性も示すため、生体組織や生体物質に吸着をほとんど起こさない。このため、生体適合性の高い素材として、生体・医学材料として盛んに研究されている。例えば、1990 年代よりフッ素化したリン脂質からなる安定なリポソームを、ドラッグデリバリー分野で応用する試みが行われている[1]。

我々は、主要生体リン脂質であるホスファチジルコリン (PC) の部分フッ素化 PC (PF-PC) を系統的に合成し、その PF-PC の膜物性・構造を調べる研究を進めている[2-6]。この PF-PC からなるリポソームに、高度好塩菌の *Halobacterium salinarum* 由来の膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) を再構成し、その系内における bR の光サイクル等の振る舞いを、

bR が本来存在する高度好塩菌の膜 (紫膜) から得られるデータと比較し調べる研究も進めている[7]。

bR 再構成系の研究では、bR の疎水性領域の長さ と脂質分子の疎水性領域の長さの一致の良さから、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) が多く用いられている。そこで、DMPC の疎水鎖末端の幾つかの水素を、フッ素に置き換えた PF-DMPC の幾つかを合成し研究を行った。その結果、末端から 4 つの炭素に結合している水素を全てフッ素で置き換えた F4-DMPC から成るリポソームに再構成した bR は、通常の DMPC のリポソームに再構成した bR の場合と異なり、F4-DMPC 膜がゲル液晶相転移を起こし膜が流動的な状態になっても、転移温度に近い温度では bR は、三量体を維持し、また bR の 2 次元格子も維持されることが見出された[7]。一方、通常の DMPC リポソームに再構成した bR では、転移に伴い、三量体が単量体に解離し、2 次元格子も消滅することが知られている[8,9]。

本研究では、温度走査 X 線回折法を用いて F4-DMPC リポソームに再構成された bR の 2 次元格子の熱安定性を調べた。同時に紫膜との比較も行った。さらに、通常の DMPC 膜の場合と bR の 2 次元格子の安定性が異なった理由を探るために、F4-DMPC の膜構造の詳細を解析することも併せて行った。これらが本研究の目的である。

2 実験

次亜硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) またはラジカル開始剤 (AIBN) を用いたヨウ化パーフルオロブチルと 9-デセン-1-オールとの反応からヨウ化物を合成し、それに引き続き、脱ヨウ素化、次に、Jones 試薬による酸化反応によりパーフルオロブチル基を有するミリスチン酸 (F4-MA) を合成した。F4-MA にグリセロール部位を導入後、ホスホコリン化反応により目的物である 1,2-di(11,11,12,12,13,13,14,14,14-nonafluorotetradecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC) を合成した。DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) は、Avanti Polar Lipids 社から購入した。

高度好塩菌 *H. salinarum* からの紫膜の単離および精製は、Oesterhelt と Stoeckenius の方法 [10] に従って実施した。精製した紫膜を 100mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁した。リポソーム中への bR の再構成は、次のように行った。まず、bR 濃度 $10 \mu\text{M}$ の紫膜溶液を、bR を可溶化するために 5 mM Triton X-100 溶液と混合し、暗所で 25°C 、12 時間以上インキュベートした。超遠心分離により Triton X-100 ミセル中の可溶化された bR を上清として得た。このミセルを、次に bR 対脂質モル比で 1 : 150 となるように、F4-DMPC または DMPC 懸濁液と混合した。混合液を 6 時間穏やかに攪拌し、続いて吸着剤 Bio-beads SM-2(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて Triton X-100 を除去した。得られた懸濁液は紫色であった。十分な X 線回折強度シグナルを得るために、遠心分離によって試料を濃縮した。最終サンプルの脂質濃度は約 100mM であった。

膜タンパク質 bR を含まない pureF4-DMPC 膜の構造解析では、流動 (液晶) 相において膨潤法(水含量を変化)[11]を適用するために、高分子溶液の浸透圧を利用した。そのため、F4-DMPC は純水、または、濃度の異なるポリビニルピロリドン (PVP) 水溶液に分散させた。平均分子量 40,000 の PVP は、Sigma 社より入手した。

X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設ビームライン BL10C および BL6A で行った。BL10C では、波長 0.10 nm、BL6A では、波長 0.15 nm の放射光 X 線ビームを使用した。検出器は両ビームラインとも、Dectris 社製の PILATUS を使用した。カメラ長の算出はベヘン酸銀を使って行った。露光時間は 1 フレーム当たり 30 秒から 120 秒の範囲で、典型的なカメラ長は、約 0.50 m であった。2 次元回折データは Fit2d の円周積算によって 1 次元に変換した。

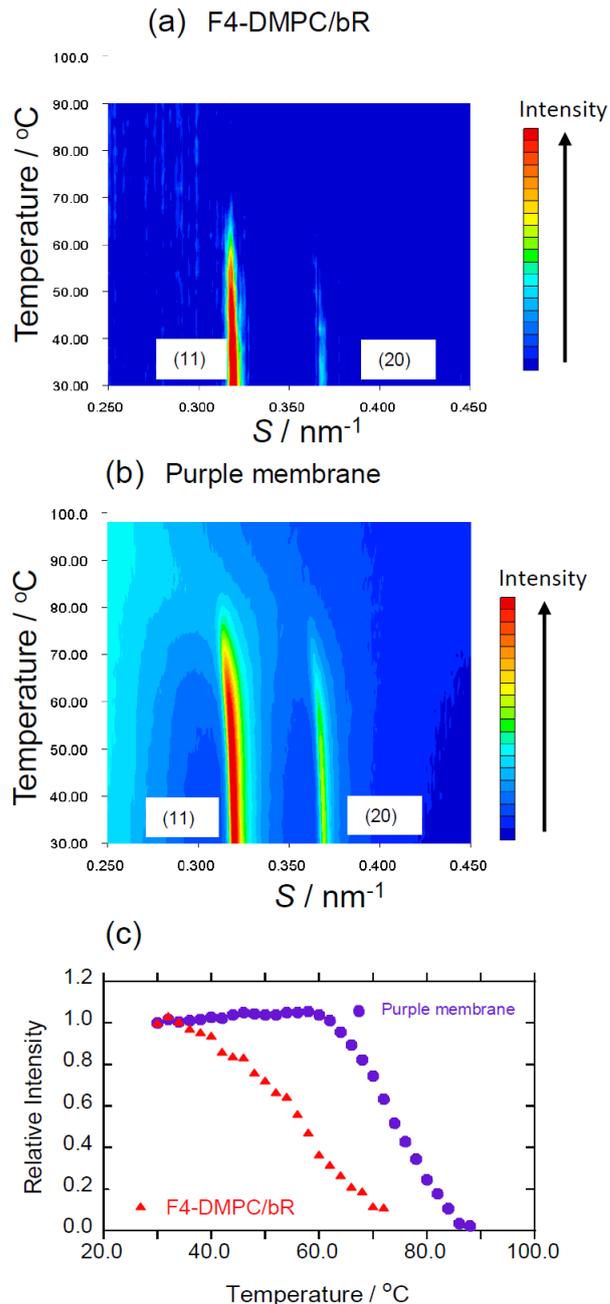


図 1 : (a)F4-DMPC/bR 系、および、(b)紫膜について $2.0^\circ\text{C}/\text{min}$ で記録された温度走査 X 線回折測定で得られた回折強度データを色の違いで表現したプロット。(c) F4-DMPC/bR 系 (▲)、および、紫膜 (●) の bR 2 次元格子からの(11)と(20)反射の積分強度の和の値の温度依存性。

3 結果および考察

熱測定の結果、脂質 : bR の比が 150:1 の試料において、転移のピーク温度は、DMPC/bR 系では、 19.8°C であった。一方、F4-DMPC/bR 系では、ピークは 2 つ観察され、それぞれ、 3.5°C と 5.8°C であった [12]。高温のピーク温度は、pureF4-DMPC 膜で観察されたピーク温度 (5.4°C) [3,4] とほぼ一致した。以前の論

文[7]で報告した通り、F4-DMPC/bR 系において、F4-DMPC の疎水鎖は融解状態にある温度 30°Cでも、X 線回折で bR の三量体が形成する 2 次元六方格子に由来する反射が観察され、そのスペーシングは、紫膜で観察されたものと一致した。本研究では、先の研究よりも広い温度範囲で、bR 三量体の 2 次元六方格子に由来する反射ピークの振る舞いを測定した。

図 1 (a)には、F4-DMPC/bR 系で観察された bR2 次元六方格子からの反射の内、強度の強い 2 つの反射、(11)および(20)反射が観察される範囲の回折角の温度変化の様子を、回折強度を色で表現したものである。同じ条件で測定した紫膜の結果は、図 1(b)に示した。図 1(c)は、(11)および(20)反射強度の和を、温度変化に対してプロットしたものである。F4-DMPC/bR 系と紫膜からの結果を比較できるようにするために、温度 30°Cの強度の和の値を基準に規格化してある。これらの図から分かるように、F4-DMPC/bR 系では、bR の 2 次元格子は温度 70°C付近まで維持されている。

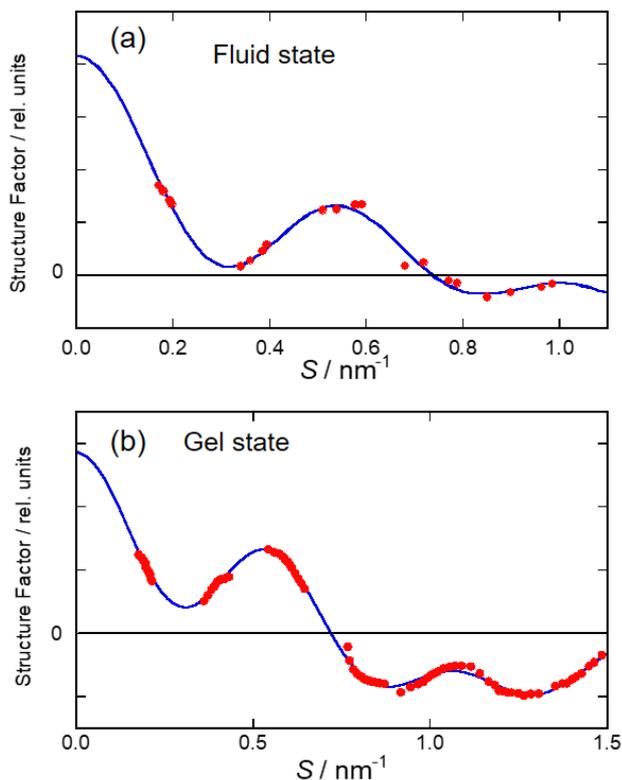


図 2：逆空間距離の関数としてプロットされた実測ラメラ回折強度から計算された (a) 液相および (b) ゲル相の pure F4-DMPC 膜の実測構造因子 (●)。曲線 (—) は、フィッティングの結果を求めた最良適合パラメータを持つモデル電子密度分布関数から計算したモデル構造因子。

天然の紫膜と比較すると、その熱安定性は劣るが、通常の DMPC 膜中に再構成した系では、転移温度 (約 20°C) で膜が流動的な状態になるのに伴い、bR

の 2 次元格子が直ちに消滅してしまう状況と比較すると、部分フッ素化鎖の存在によって、bR の 2 次元格子の熱安定性に著しい向上がもたらされたと言える。また、これは、円二色性 (CD) 測定で、bR の三量体-単量体転移を調べた結果[9,12]とも一致しており、bR の 2 次元格子の消滅に伴い、それとほぼ同時に、bR の三量体は、単量体に解離する。この結果は、アシル鎖の長さの異なる他の飽和 PC、すなわち、ジパルミトイル-PC(DPPC)、ジステアロイル-PC(DSPC)でも同様な結果が報告されている[9]。

CD および X 線回折測定は、F4-DMPC 膜の bR 分子の四次構造の変化が、F4-DMPC 膜の疎水鎖の融解転移 (ゲル液晶転移) と無関係であることを示した。これは、通常の飽和 PC 膜の場合とは対照的である。次に、この違いをもたらす要因を、構造的観点から、次に探ることとした。回折強度データを解析することによって、pure F4-DMPC 膜のゲル相および流動 (液晶) 相における詳細な二重層膜構造を調べた。

第一段階として、観測データから膜構造の相対電子密度分布プロファイルを計算した。電子密度分布を計算するために必要な位相は、PVP 水溶液 (20,30,40,50wt% の 4 種の濃度)、または、氷の存在によって引き起こされる浸透圧を加えることに多重層ベシクルの水層の厚さを変える膨潤法[11]で得られたデータを解析することによって決定した。

次に、さらに詳細な解析を行うために、得られた相対電子密度プロファイルを参考に、パラメータを含む箱型関数を基本とするモデル電子密度分布を構築し、そのモデル電子密度から計算される構造因子を、実測の構造因子にフィッティングすることで、最適パラメータを決定した。モデル電子密度分布は、観測されるラメラ反射の数が少ない流動 (液晶) 相の場合では、フッ素化した末端の CF₃ 部分、CF₂ 鎖部分、通常の炭化水素 CH₂ 鎖部分、極性頭部の 4 つの部分から構成されるようにし、ゲル相では、極性頭部が 2 つの箱型関数で表現されるとした。図 2 にフィッティングの結果を示した。この解析から、フッ素化した CF₂ 鎖部分の長さは、ゲル相と流動 (液晶) 相の両方で同じ値 (0.40nm) であることが分かった。この結果は、フッ素化鎖領域がゲル液晶相転移温度を超えても、ゲル相と同じ立体配座を保つことを示唆している。つまり、フッ素化鎖領域は、明確な融解挙動を示さないようである。

4 まとめ

部分フッ素化リン脂質の F4-DMPC からなる膜に再構成された bR は、F4-DMPC 膜が流動状態にある 30°Cでも三量体であり、その三量体は 2 次元六方格子を充填していることが、CD および X 線回折測定から報告されていたが、本研究では、さらに高温での振る舞いを調べた。CD によって検出される単量体への三量体の完全な解離は、約 70°Cで起こり、X 線回折によって観察される 2 次元六方格子の消滅温度とほぼ一致した。これは、天然紫膜における bR の場合より約 10°C低い、通常のリン脂質 DMPC 膜

における **bR** 三量体の解離が約 19°C で起こることと比較すると、極めて高い熱安定性を示したことになる。熱安定性の違いの理由を探求するために、電子密度モデルを用いてラメラ回折強度データを分析することによって、純粋な **F4-DMPC** 二重層の構造的特徴を探った。その結果は、**F4-DMPC** 膜がゲル液晶相転移を起こしても、疎水性鎖のフッ素化部分は、顕著な立体配座変化を起こさないことが示唆された。それが **bR** 三量体によって形成された 2 次元六方格子の高い熱安定性に寄与している可能性がある。

まだ 1 種類の膜タンパク質しか検討していないが、**PF-PC** から成る膜中に再構成した膜タンパク質が広い温度範囲に渡って、その 4 次構造を維持することを示した本研究の結果は、**PF-PC** が、膜タンパク質の研究における有用なツールになりうる可能性を示唆する。

謝辞

X 線回折実験を実施するにあたり、Photon Factory の清水伸隆教授、五十嵐教之教授、そして SAXS ビームラインスタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝を申し上げます。

参考文献

- [1] C. Santaella *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **30**, 567 (1991).
- [2] K. Takai *et al.*, *J. Fluorine Chem.* **129**, 686-690 (2008).
- [3] M. Yoshino *et al.*, *Chem. Lett.* **41**, 1495-1497 (2012).
- [4] H. Takahashi *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **559**, 107-111 (2013).
- [5] T. Hasegawa *et al.*, *ChemPlusChem* **79**, 1421-1425 (2014).
- [6] T. Yanagi *et al.*, *Biophys. Rev.* (in press)
- [7] M. Yoshino *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **117**, 5422-5429 (2013).
- [8] R. J. Cherry *et al.*, *J. Mol. Biol.* **121**, 283-298 (1978).
- [9] Y. Yokoyama *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **114**, 15706-15711 (2010).
- [10] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Nat. New Biol.* **233**, 149-152 (1971).
- [11] N. P. Franks, *J. Mol. Biol.* **100**, 345-358 (1976).
- [12] H. Takahashi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 631-642 (2019).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp