

液晶相状態の部分フッ素化脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンの 2次元格子

Two-Dimensional Lattice Structure of Bacteriorhodopsin Reconstituted in Partially Fluorinated Phosphatidylcholine Bilayers

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

¹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

²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

³産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター, 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1

⁴北海道大学 先端生命科学研究院, 〒060-0808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目

⁵名古屋大学大学院工学研究科, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

Hiroshi Takahashi^{1*}, Masaru Yoshino², Toshiyuki Takagi³, Takashi Kikukawa⁴, Yasunori Yokoyama⁵,
Hideki Amii², Toshiyuki Kanamori³, and Masashi Sonoyama²

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

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

³ Research Center for Stem Cell Engineering, AIST, Tsukuba, 305-8565, Japan

⁴ Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, 060-0810, Japan

⁵ Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, 464-8603, Japan

1 はじめに

生体膜上では、生命にとって重要な様々な生化学反応・活動が行われている。その機能の主要な担い手は、生体膜の脂質膜部分に埋められた膜タンパク質である。膜タンパク質の機能は、それを取り囲む脂質から影響を受けると考えられているが、膜タンパク質の構造・機能に対する脂質の影響が詳細に調べられている例は、極めて少ない。これは主に、膜タンパク質の精製および人工膜へ再構成することの困難さが原因となっている。また、膜タンパク質を人工膜に再構成できたとしても天然由来の脂質を利用する場合には、その種類の変化には制限が付く。

我々は、リン脂質の末端の炭化水素の一部のみをフッ素で置換した新規脂質を合成[1]し、この部分フッ素化リン脂質より成る人工膜に、膜タンパク質を再構成し、その構造・機能に対する脂質種による影響の違いを調べる研究を進めている。部分フッ素化リン脂質に注目するのは、次のような利点があるからである。膜タンパク質へ与える影響を考慮した分子設計が、可能である。例えば、膜タンパク質と直接的に相互作用する疎水部分の状態を、疎水部分に導入するフッ素の数を調整することで変えることができる。この様に天然の細胞膜から摂動をかけた系を自由に用意できるため、膜タンパク質・脂質相互作用の系統的な研究ができる。

研究対象の膜タンパク質としては、研究の蓄積が豊富な、高度好塩菌 *H. salinarum* の紫膜由来の膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)を選んだ。部分フッ素化リン脂質として、人工脂質膜で一般的によく用いられている天然型リン脂質の Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)の末端ブチル基の水素原子を全てフッ素原子に置換した新規部分フッ素化リン脂質 Dinonafluorotetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC, Figure 1)を、まず合成した。この F4-DMPC 膜に、bR を再構成し、その再構成 bR を天然状態にある bR、紫膜との比較を行った。得られた再構成試料の分光学的測定結果から、紫膜と同様に、bR は膜内で三量体を形成していることが示唆された。

本研究では、F4-DMPC 膜中で作る bR の三量体が作る 2次元格子の構造、および、その構造が F4-DMPC 膜の相転移によって、どう影響を受けるかを X線回折測定により調べた。

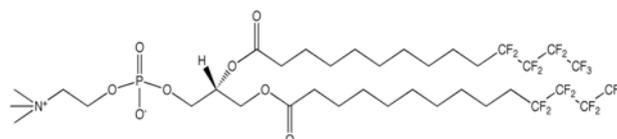


図 1: Dinonafluorotetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC) の化学構造

2 実験

部分フッ素化リン脂質 Dinonafluorotetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC)の合成は、既報の方法[1]によって行った。再構成 bR 試料の作製方法は他[2,3]で詳しく述べたので、概略のみを以下に述べる。紫膜からのバクテリオロドプシン(bR)の可溶化には界面活性剤の Triton X-100 を使用した。bR を含む界面活性剤ミセルと F4-DMPC から成るベシクルを混合した後に、界面活性剤を吸着する Biobeads SM-2 を使い、徐々に Triton X-100 を取り除き、F4-DMPC ベシクルに bR を再構成した。緩衝液は、リン酸緩衝液 (pH 7.0, 100 mM) を使用した。まず、bR および脂質膜の最終濃度はそれぞれ約 5 μM 、750 μM になるように調製したが、この濃度では X 線回折実験では十分な強度が得られないため、遠心操作で濃縮を行った。

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、300K (Dectris、スイス) を使用した。

3 結果および考察

天然型リン脂質 DMPC の二重層膜は、約 23°C で炭化水素鎖の融解に伴う相転移現象を起こす。部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC も、同様な相転移現象を示すが、その転移温度は、約 5°C と、対応する DMPC と比較する大分低い[4]。DMPC 膜に再構成した bR は、転移温度以下では、紫膜と同じく三量体で存在するが、DMPC 膜が液晶相に転移し、流動的な状態になると単量体になることが知られている。この変化は、円二色性スペクトルで観察できる。DMPC 再構成膜における bR では、DMPC がゲル相であると bipolar な可視 CD スペクトルが観測されるが、液晶相へ転移すると、単一の positive peak となる。同様な実験を、F4-DMPC 再構成 bR で行ったところ、液晶相の 30 °C でも、ゲル相と同様な bipolar な可視 CD スペクトルが観察された。この結果は、少なくとも 30 °C までは F4-DMPC 膜中で、bR は三量体で存在していることを示している

紫膜中では、bR の三量体は、2 次元の六方格子に充填している。X 線回折の結果は、F4-DMPC 膜内でも、bR の三量体は、2 次元の六方格子に充填していることが確認された[4]。また、その格子定数は、誤差の範囲で、紫膜の場合の格子定数と一致した。

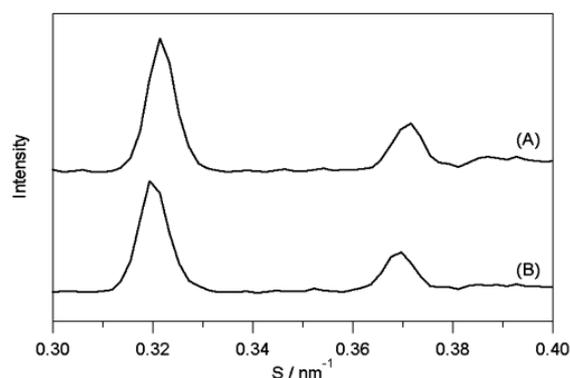


図2 : F4-DMPC 膜に再構成した bR の 2 次元格子からの X 線回折像 (a) 2 °C (b) 30 °C

また、CD 測定の結果と一致して、その 2 次元格子は 30 °C の液晶相の F4-DMPC 膜でも変化なく同様に観察された (図2)。bR が添加されることで、F4-DMPC 膜の相転移温度が変化する可能性もあったが、広角領域には、ブロードな散乱しか観察されず、bR 存在下でも、本研究で使用したモル比であれば、30 °C の温度においては F4-DMPC は、液晶相であったことは確認した。

脂質の違いが、bR の三量体形成に影響することを明確に示すことができた。

参考文献

- [1] T. Takagi *et al.*, *J. Fluorine Chem.*, **132**, 427-429 (2011).
- [2] M. Sonoyama *et al.*, *Chem. Lett.*, **38**, 1134-1135 (2009).
- [3] Y. Yokoyama *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 15706-15711 (2010).
- [4] M. Yoshino *et al.*, *Chem. Lett.* **41**, 1495-1497 (2012).
- [5] M. Yoshino *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 5422-5429 (2013).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp