

# 生体膜タンパク質OmpFの構造形成中間体の可溶化状態の物性評価

渡邊 康・(独) 食品総合研究所、猪子洋二・大阪大学大学院基礎工学研究科

Characterization of the refolded dimer of an integral membrane protein OmpF porin in solution

Y. Watanabe<sup>1</sup>, Y. Inoko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-853, Japan

生命科学および生体物質科学あるいは食品科学において、タンパク質の構造科学的な研究は、特に、フォールディングや集合化の問題に関係して、そのタンパク質の機能解明やその有効利用のために重要な意義がある。生体膜(疎水性)タンパク質の研究は、多くの研究者により研究が精力的に進められているものの、水溶性タンパク質に比べると依然として基本的な構造物性の知見の蓄積が必要な状況である。OmpF ポーリンは、大腸菌の外膜に内在する受動的な拡散孔あるいはファージの受容体として機能している3量体の生体膜タンパク質である。X線結晶解析より、37,000の分子量のサブユニットは、16ストランドのβバレル構造を持つことが明らかとなっている。

変性モノマーから安定した3量体への復元の実験は、いくらか報告されている。大豆レシチンと市販されていない非イオン界面活性剤 polydisperse octyl-oligoethyleneoxide を利用した透析法が、6M グアニジン塩酸塩で変性させたモノマーからの3量体化に有効であることが報告された。最近、我々はオクチルグルコシド (n-octyl-β-D-glucopyranoside) のような穏やかな界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウム存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動解析により、変性モノマーと天然3量体の中間の位置に泳動する分子の形成を示すことを報告した。さらに、その条件における変性モノマーから安定構造への形成過程の解析から、再生2量体形成が高次会合体形成に混在することを示唆する結果を得た。これまで2量体が重要な集合中間体であると考えられてきたものの、その物理化学的特性について十分に知られていないため、この研究では、単離再生試料の特徴を、レーザー光線散測定、円二色性スペクトル測定およびBL10C(酵素回折計)を利用した小角溶液X線散乱測定をした結果について報告する。

再生は、非イオン界面活性剤オクチルグルコシド溶液を等量の熱変性モノマー試料溶液に添加することにより検討した。本タンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム存在下においても室温においてはその3量体構造を維持しているので、再生の達成はドデシル硫酸ナトリウム存在下のゲル電気泳動法で確認できる。本研究では、分子再集合過程で得られた再生単離試料を溶液X線散乱測定(PF-BL10C 酵素回折計)に供した。オクチルグルコシド中においては再生タンパク質界面活性剤複合体の回転半径は約4nmで、同条件での天然3量体複合体の回転半径と同等であった。また、ゼロ角度散乱強度値は、2量体であることを示した。同時に、円二色性スペクトルは天然構造に似たβ構造を示唆するものであり、光散乱測定からも分子量が2量体であることを示す結果を得た。さらに、この2量体の熱安定性は天然3量体より不安定であることもわかった。これらの結果とこれまでの知見を参考に、本タンパク質の構造形成機構について論ずる。