

タンパク質構造安定性に対するタンパク質間相互作用の寄与

- 再構成膜中のバクテリオロドプシンの変性実験 -

(名古屋大学大学院工学研究科) 根岸瑠美、美宅成樹

【序】

バクテリオロドプシンは *H. salinarum* に存在する 7 回膜貫通型タンパク質であり、天然状態ではバクテリオロドプシンと脂質分子で紫膜と呼ばれる六方格子状の二次元結晶構造を形成する。バクテリオロドプシンの熱変性実験から、光照射により構造安定性が低下する（暗中には 70 °C 以上、光照射下では 60 °C 以上で不可逆な退色を起こす）光退色現象が明らかになった。また、光退色現象を起こす 60 °C は紫膜の二次元結晶構造の融解開始温度でもある [1]。一方、界面活性剤 Octyl- β -glucoside、TritonX-100 に可溶化したバクテリオロドプシンでも光退色現象が観察されている [2][3]。光退色現象と二次元結晶融解の温度の関係、および可溶化による光サイクル還元力の消失から、光退色現象はタンパク質-タンパク質間相互作用の影響を受けることが示唆されている。

界面活性剤による可溶化、脂質二重層への再構成によりバクテリオロドプシンの環境を変化させることができる。これまで紫膜中のバクテリオロドプシン、可溶化バクテリオロドプシンの光退色現象については議論されてきた。しかし、可溶化バクテリオロドプシンの結果からはタンパク質-界面活性剤相互作用により構造が不安定化している可能性を排除できない。そこで本研究では可溶化バクテリオロドプシン同様にタンパク質分子同士が結合していない状態を脂質二重膜上で再現できる再構成膜バクテリオロドプシンを用い、熱変性、光退色実験を行った。

【実験方法】

合成脂質膜中に再構成されたバクテリオロドプシンでは、脂質のゲル-液晶相転移により二次元結晶が融解する [4]。そこで今回、紫膜バクテリオロドプシンの光退色温度 60 °C よりも低温の 23.9 °C に相転移温度を持つ中性脂質、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) を脂質に選び、DMPC 二重層にバクテリオロドプシンを再構成した。

次に再構成膜中のバクテリオロドプシンの三次構造安定性評価のために紫外・可視吸収測定を行い、DMPC の相転移温度と紫膜バクテリオロドプシンの熱変性温度を含む広い温度領域で構造変化の温度依存性を調べた。バクテリオロドプシンは天然状態では 560 nm に吸収ピークを持つスペクトルを示すが、高温インキュベーションによりピークは低波長側へシフトする。このとき 560 nm の吸収値は下がるが、変性しているのではなく天然状態とは異なる状態へ構造変化していることを示す。本研究では可逆な構造変化と変性を区別するために以下の測定方法を行った。まず再構成バクテリオロドプシンを各温度、暗、光照射下で 60 分間インキュベーションした。そして各サンプルは 60 分経過時に急冷し、4 °C、暗で一昼夜保存したものを 20 °C、暗で測定した。こうして得られた 560 nm の吸収値の大きさを可逆な成分とし、各温度、暗、光照射下で比較した。

また、ゲル相である DMPC 膜中のバクテリオロドプシン構造安定性を調べるため、暗、10 °C で 1-プロパノール添加実験を行い、構造変化のアルコール濃度依存性を調べた。

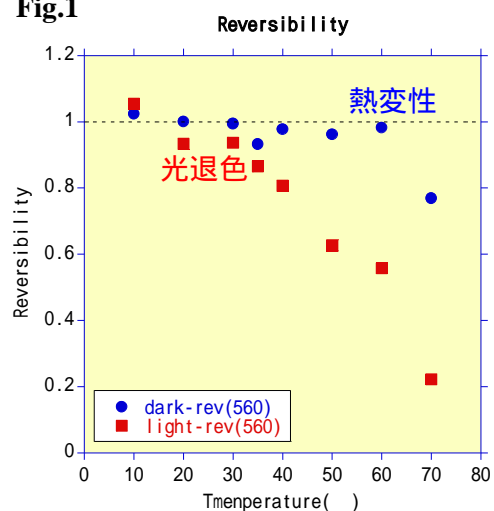
【結果】

再構成膜中のバクテリオロドプシンにおける円二色性測定（可視領域）の結果を以下に示す。10-15℃では紫膜中のバクテリオロドプシンと同様、520 nm 付近に正、600 nm 付近に負の極大を持つエキサイトンバンドが、25℃以上では発色団の最大吸収波長である560 nmにピークを持つポジティブバンドが観察された。この結果はDMPCのゲル-液晶相転移によりバクテリオロドプシンの二次元結晶構造が融解したことを意味し、再構成DMPC膜中のバクテリオロドプシンは15-20℃の間で二次元結晶構造が崩壊し、20℃以上でバクテリオロドプシン同士が結合していない状態として存在することを示した。

紫外・可視吸収測定の結果を以下に示す。再構成膜中のバクテリオロドプシンは暗中で60℃以上、照射下では30℃以上で構造変化可逆性の低下が見られた（Fig.1）。この結果は二次元結晶が融解した液晶相の再構成膜中（20℃以上）でもバクテリオロドプシンの光退色が観察されることを示した。

1-プロパノール添加実験（10℃、暗）の結果を以下に示す。1-プロパノール濃度を0-2.0 Mに変化させた際、紫膜バクテリオロドプシンでは1.4 M以上で560 nmの吸収の減少が観察された。一方、同様の測定を再構成膜中のバクテリオロドプシンに対して行ったところ、1-プロパノール濃度0-2.0 Mの変化の際、560 nmの吸収の減少と共に、最大吸収波長の低波長シフトが顕著に観察された。この結果と円二色性測定（10℃）の結果から、再構成膜中のバクテリオロドプシンは再構成膜がゲル相のとき、二次元結晶構造を形成しているが紫膜中のバクテリオロドプシンとは異なる状態にあることを示す。

Fig.1



【考察】

再構成膜中のバクテリオロドプシンと紫膜中のバクテリオロドプシンではどちらの結果も光退色温度の方が熱変性温度よりも低かった（光退色現象が観察された）。これは光中間体が暗での構造（基底状態）よりも不安定であることを示している。また、再構成膜中の方が紫膜中に比べて熱変性温度と光退色温度の差が大きいことから、近傍のバクテリオロドプシンとの間にはたらくタンパク質間相互作用は、基底状態よりも光中間体の構造安定化に与える影響が大きいと考えられる。これらの結果から、二次元結晶中ではたらくタンパク質間相互作用は光中間体構造が基底状態の構造へ復元できなくなるのを抑えていると結論づけられるのではないだろうか？

参考文献

- [1] Y.Yokoyama, M.Sonoyama, S.Mitaku (2002) J.Biochem. 131, 785-790
- [2] Y.Mukai, N.Kamo, S.Mitaku (1999) Protein Eng. 12, 755-759
- [3] T.Sasaki, M.Sonoyama, M.Demura, S.Mitaku (2005) Photochem Photobiol. 81 1131-1137
- [4] N.A.Dencher, M.P.Heyn (1982) Methods Enzymol. 88, 31-35