

再構成バクテリオロドプシンの二次元結晶化に関する研究

(名古屋大学大学院工) ○根岸瑠美, 鬼頭琢, 美宅成樹

【序】

バクテリオロドプシンは *H. salinarum* から精製される α ヘリックス7回貫通型膜タンパク質であり、光を受容することでプロトンポンプ活性をもつ。また天然状態ではバクテリオロドプシンは三量体で存在し、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。一方、人工脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンは脂質のゲル-液晶相転移温度以上で二次元結晶融解を起こす [1]。この性質を利用し、二次元結晶の形成、融解によるバクテリオロドプシンの構造安定性の変化を暗中、光照射下で比較すると、二次元結晶が融解したバクテリオロドプシンは光照射下でのみ構造が不安定化することがわかった。この結果はバクテリオロドプシンの二次元結晶形成は機能活性に重要な役割を果たしていることを意味する。では天然状態でバクテリオロドプシンが二次元結晶を形成するために、どのような相互作用や物性が影響しているのだろうか？本研究ではバクテリオロドプシンの二次元結晶形成に影響する相互作用を調べるため、溶液塩濃度と膜脂質の種類を変化させ再構成バクテリオロドプシンの二次元結晶融解を評価した。なお塩濃度の変化から静電相互作用の影響を、膜脂質の種類から脂質相転移の影響を検討した。

【実験】

細胞膜中で膜タンパク質にはたらく相互作用を調べるために、再構成バクテリオロドプシンを用い、その二次元結晶融解曲線が変化する条件を調べた。バクテリオロドプシンを人工脂質小胞に再構成するために、透析とバイオビーズを組み合わせた界面活性剤除去を行った [2]。実験条件を以下に示す。バクテリオロドプシンの可溶化には界面活性剤 TritonX-100 を使用した。可溶化バクテリオロドプシンと脂質小胞の懸濁液を混合した後（脂質 - タンパク質分子量比 (L/P) = 150）、界面活性剤を除去し、再構成バクテリオロドプシンとした。得られたサンプルは NaCl 濃度の異なる 100 mMリン酸緩衝液に懸濁した。再構成バクテリオロドプシンの二次元結晶は可視領域の円二色性測定を、三次構造の変化は紫外・可視吸収測定を用いて評価した。

【結果】

再構成膜中のバクテリオロドプシンは脂質のゲル - 液晶相転移点以下の温度領域では二次元結晶を形成し、ゲル - 液晶相転移点以上では単量体化することが知られている。しかしその融解挙動を詳細に調べると融解開始温度と融解終了温度の間には約 12.5 °C の違いが見られ、二次元結晶の融解温度には幅があることがわかった。さらに再構成バクテリオロドプシンの二次元結晶化に対する静電相互作用の影響を調べ

るために、サンプルを懸濁している緩衝液の NaCl 濃度を 0.0 - 2.0 M と変化させ、静電遮蔽条件下での二次元結晶融解挙動を調べた。結果は融解開始点と融解終了点の温度差は NaCl 濃度によらず約 12.5 °C で一定でありながら、融解曲線は NaCl 濃度の上昇に伴い全体的に高温へシフトした。

次に膜脂質の相転移の影響を調べるため、アシル鎖長の違う 2 種の人工脂質、ジミリストイルフォスファチジルコリン (DMPC) とジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) に再構成したバクテリオロドプシンで二次元結晶融解挙動を比較した。アシル鎖長の違いにより 2 種の脂質膜ではゲル - 液晶相転移点が異なる。DMPC では 24 °C、DPPC では 42 °C にゲル - 液晶相転移点を持ち、再構成したバクテリオロドプシンの二次元結晶融解も各相転移点付近で観察された。また DPPC 膜中のバクテリオロドプシンでのみ、ゲル - 液晶相転移点付近の二次元結晶融解とは別に低温 (20 - 30 °C 付近) で二次元結晶の状態が変化するような挙動が観察された。

【考察】

溶媒の NaCl 濃度を上げることで二次元結晶融解は高温へシフトした。この結果は静電相互作用の遮蔽により再構成膜中のバクテリオロドプシン分子間の結合力が強化されたことを意味する。タンパク質間結合が強化した可能性としては「引力が強まる場合」と「斥力が弱まる場合」の二通りが考えられるが、静電遮蔽によりデバイ距離が短くなったことから「バクテリオロドプシンにはたらく斥力が弱まった」と考察するのが妥当であろう。このことは二次元結晶中でバクテリオロドプシン間にはたらく静電相互作用は斥力支配的であることを意味する。従ってバクテリオロドプシン分子が集合して二次元結晶を形成するためには、静電相互作用以外の引力的な相互作用がはたらいっていると考えられる。

一方、相転移温度の違う脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンで二次元結晶融解挙動を比較した。DMPC、DPPC サンプル共にゲル - 液晶相転移点以上で二次元結晶の融解が観察されたが、DPPC 膜中のバクテリオロドプシンでのみ低温領域で二次元結晶状態の変化が観察された。この DPPC 膜における低温領域での二次元結晶状態の変化は DPPC の副転移点に対応するという見方ができる。脂質の相状態の変化によりバクテリオロドプシンの二次元結晶状態が影響を受けたことから、二次元結晶形成には脂質の流動性が重要である可能性が示唆された。講演では脂質の相状態が変化することによるバクテリオロドプシン二次元結晶への影響を議論する。

【引用文献】

1. M. P. Heyn *et al.* Biochem. 20, 840-849 (1981)
2. N. A. Dencher *et al.* Methods Enzymol. 88, 31-35 (1982)