

3P088

疎水鎖末端をパーフルオロアルキル基に置換した **DMPC** 脂質二分子膜中の  
膜タンパク質の構造・機能・安定性

1.パーフルオロアルキル基によるバクテリオロドプシンの安定化

(群馬大院理工<sup>1</sup>, 北大・先端生命<sup>2</sup>, 産総研創薬基盤<sup>3</sup>)

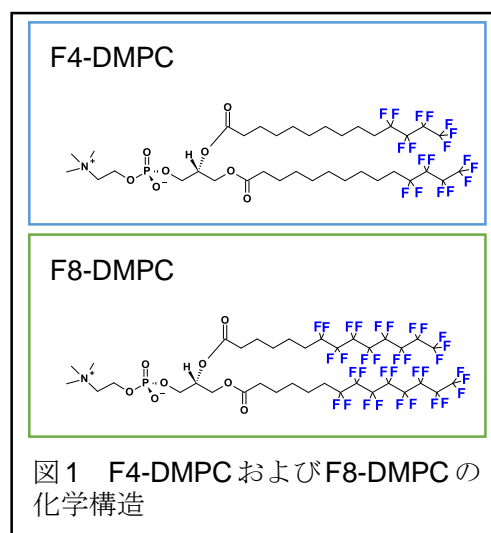
○橋本 麻美<sup>1</sup>, 村井 裕佳<sup>1</sup>, 森田 康平<sup>1</sup>, 高橋 浩<sup>1</sup>, 網井 秀樹<sup>1</sup>, 菊川 峰志<sup>2</sup>,  
高木 俊之<sup>3</sup>, 金森敏幸<sup>3</sup>, 園山 正史<sup>1</sup>

**Structural and functional properties of membrane proteins reconstituted in partially fluorinated DMPC bilayer: 1. Stabilization of bacteriorhodopsin by introduction of perfluoroalkyl chains in the hydrophobic tails of DMPC (Div. Mol. Sci., Gunma Univ.<sup>1</sup>, Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ.<sup>2</sup>, AIST<sup>3</sup>)**

OMami Hashimoto<sup>1</sup>, Yuka Murai<sup>1</sup>, Kohei Morita<sup>1</sup>, Hiroshi Takahashi<sup>1</sup>, Hideki Amii<sup>1</sup>,  
Takashi Kikukawa<sup>2</sup>, Toshiyuki Takagi<sup>3</sup>, Toshiyuki Kanamori<sup>3</sup>, Masashi Sonoyama<sup>1</sup>

【序】アルキル基の水素原子を全てフッ素原子に置換したパーフルオロアルキル(Rf)基を含む両親媒性分子は、通常アルキル鎖のみからなる両親媒性分子とは異なる際だった特徴を示すことが知られている。近年私たちは、Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) の疎水鎖末端ブチル基をパーフルオロブチル基に置換した新規部分フッ素化リン脂質 **F4-DMPC** (図1) を新たに開発し、DMPC と比較して、ゲル-液晶相転移温度の低下や水面上単分子膜の崩壊圧の上昇を始めとする **F4-DMPC** に特有な膜物性を明らかにした<sup>1)</sup>。さらに膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)の **F4-DMPC** 二分子膜への再構成を試みたところ、高い収率での再構成に成功し、再構成した bR (以下 **bR/F4-DMPC** と略す) は、天然紫膜類似の二次元結晶構造および光サイクルを示すことがわかった<sup>2)</sup>。また、光照射下および暗中所ける変性実験から、**bR/F4-DMPC** は DMPC 二分子膜中の bR (以下 **bR/DMPC** と略す) よりも高い安定性を示した<sup>2)</sup>。以上の結果から、Rf 基を疎水鎖末端に導入した部分フッ素化リン脂質は膜タンパク質の再構成基材として有用であり、また部分フッ素化リン脂質二分子膜中の bR は、非含フッ素脂質膜中に比べて安定化されていることが示唆された。そこで本研究では、脂質分子への Rf 基の導入が再構成膜タンパク質の構造や物性に与える影響をさらに調べるために、Rf 鎖長を n=8 に伸長した **F8-DMPC** を新たに合成し、**F8-DMPC** 二分子膜への膜タンパク質 bR の再構成を行った。得られた再構成 bR (以下 **bR/F8-DMPC** と略す) の光照射下及び暗中所ける変性実験、過渡吸収測定、可視円二色性スペクトル測定を行い、**bR/DMPC**、**bR/F4-DMPC** および天然紫膜との比較から、膜タンパク質に対する Rf 基導入の効果について考察した。

【実験】部分フッ素化リン脂質 **F8-DMPC** の合成は、**F4-DMPC** の合成法<sup>1)</sup>に準じて行った。**F8-DMPC** への bR 再構成は既報に従った<sup>2)</sup>。調製した **bR/F8-DMPC** の熱変性・光誘起変性測定は Beckmann DU7500 を用いて行い、bR 由来の 570 nm の吸光度変化から変性挙動を解析した。また 532 nm 励起の過渡吸収測定システム<sup>2)</sup>を用いて、いくつかの光機能中間体の生成・減衰挙動を



解析した。また、脂質二分子膜中の bR の四次構造を日本分光 J-820 により調べた。

【結果】 F8-DMPC 二分子膜への bR 再構成は、これまでの bR/F4-DMPC や bR/DMPC と同等の高い収率で行うことに成功した。bR/F4-DMPC では天然紫膜に比較して長波長シフトを示したが、bR/F8-DMPC では天然紫膜と同様の吸収極大波長は 560 nm に観測された。次に、bR 分子の集合

状態を調べるために可視 CD スペクトルを測定したところ、正の極大ピークと負の極大ピークからなるスペクトルパターンが 60 °C 付近まで観測された。このことは、約 60 °C まで bR/F8-DMPC は三量体構造を保持していることを示す。さらに 70 °C に加熱すると負の極大ピークは弱くなる傾向が観測されたが(図 2)、70 °C においても完全に単量体には解離していないことが考えられる。このスペクトル変化は天然紫膜でも観測される現象であり、天然紫膜に匹敵する構造安定性を有すると考えられる。このことは DMPC のゲル-

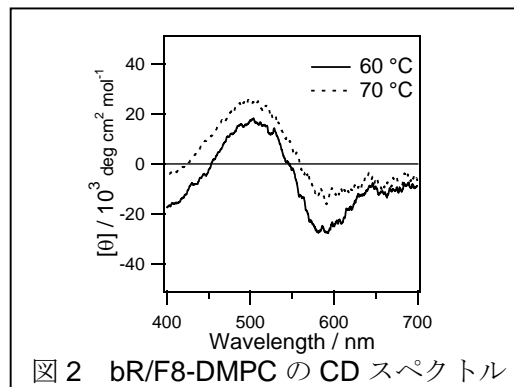


図 2 bR/F8-DMPC の CD スペクトル

液晶相転移に伴い 20 °C 付近で bR/DMPC は三量体から単量体に解離すること、および 5 °C 付近にゲル-液晶相転移を示す bR/F4-DMPC は液晶相状態にある 50 °C 付近まで三量体を保持することと比較すると際立った特徴であると言える。

さらに熱や光に対する安定性を詳細に調べるために、bR/F8-DMPC の熱変性・光誘起変性測定を行った。その結果、暗中では 70 °C・4 時間後における変性率は約 1 割程度であり、熱安定性が非常に高いことが示された。一方光照射下では 50 °C・4 時間において変性が観測された。天然紫膜中の bR の場合、暗中では 70 °C 以上になると変性が始まり、光照射下の変性は 60 °C 以上で観測されることが報告されている<sup>3)</sup>。また bR/F4-DMPC は 50 °C・2 時間において光誘起変性を示し、熱変性も観測されることから、bR/F8-DMPC は天然の bR に匹敵する際だった高い安定性を有するといえる。

bR の機能発現において重要な中間体である M 中間体の 30 °C における生成・減衰挙動を、過渡吸収を用いて調べた結果、bR/F8-DMPC では減衰は遅くなるものの、天然紫膜中の bR と同様に約 0.1 ms で M 中間体が生成することがわかった。この挙動は、bR/DMPC で観られる極めて早い M 中間体の生成及び遅い減衰とは著しく異なる。また、生成挙動は類似しているものの遅い減衰成分が新たに現れる bR/F4-DMPC に比べて、F8-DMPC は天然紫膜中の bR に類似した M 中間体の生成・減衰過程を示すと言える。

以上のことより、bR/F8-DMPC は、bR/DMPC や bR/F4-DMPC に比べて際立った熱・光に対する安定性を示し、また天然紫膜類似の光サイクルを持つことがわかった。したがって、F4-DMPC よりもさらにパーフルオロアルキル鎖長を伸長させた F8-DMPC 二分子膜は膜タンパク質の再構成材料として非常に有用であるといえる。

#### 【参考文献】

1. M.Yoshino, H.Takahashi, T.Takagi, T.Baba, K.Morita, H.Amii, T.Kanamori and M.Sonoyama., *Chem.Lett.*, **41**, 1495(2012).
2. M.Yoshino, T.Kikukawa, H.Takahashi, T.Takagi, Y.Yokoyama, H.Amii, T.Baba, T.Kanamori and M.Sonoyama., *J. Phys. Chem. B.*, **117**, 5422(2013).
3. Y.Yokoyama, M.Sonoyama and S.Mitaku., *PROTEINS:Structure, Function, and Bioinformatics*, **54**, 442(2004).