

## 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

### 2.DMPC を含む二成分系混合膜におけるバクテリオロドプシンの分配挙動

(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>) ○堀越 未希<sup>1</sup>, 吉野 賢<sup>1</sup>, 金山 賢治<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: 2. Distribution of bacteriorhodopsin in binary membrane composed of DMPC and its partially fluorinated analogs

(Div. Mol. Sci., Gunma Univ.<sup>1</sup>, Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ.<sup>2</sup>, AIST<sup>3</sup>) ○Miki Horikoshi<sup>1</sup>,  
Masaru Yoshino<sup>1</sup>, Kenji Kanayama<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>

【緒言】アルキル基の全ての水素をフッ素置換したパーフルオロアルキル(Rf)基を有する化合物は、通常アルキル鎖のみからなる化合物との親和性が低いことが知られている。私たちはこの性質に着目して、相分離によりドメイン構造を形成する脂質二分子膜の創製および膜タンパク質研究への応用を目指して、リン脂質の疎水鎖末端に Rf 基を導入した新規部分フッ素化リン脂質の開発を行っている。代表的な二本鎖リン脂質であるジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) の末端ブチル基の全水素をフッ素化した新規部分フッ素化リン脂質(以下 F4-DMPC、Figure 1 )

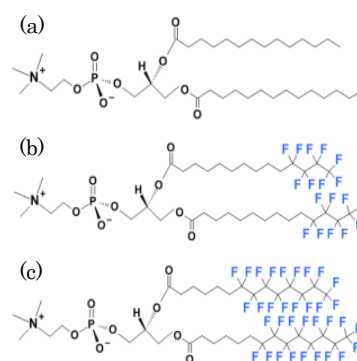


Figure 1. Chemical Structures of (a) DMPC, (b) F4-DMPC and (c) F8-DMPC

と DMPC からなる二成分系混合膜は強く相分離し、それぞれの脂質に富むドメイン構造を形成することを、熱測定および相図の解析から私たちは近年明らかにした<sup>[1]</sup>。本研究では、部分フッ素化リン脂質と膜タンパク質の親和性に関する知見を得るために、Rf 基をさらに伸長し疎水鎖末端をパーフルオロオクチル基に置換した新規部分フッ素化リン脂質 (以下 F8-DMPC、Figure 1 ) を新たに開発し、2 種類の二成分系混合膜 F4-DMPC/DMPC および F8-DMPC/DMPC における膜タンパク質バクテリオロドプシ (bR) の分配挙動とフッ素導入量の関係を調べることを目的とした。合成脂質膜に再構成した bR の可視吸収極大波長や分子集合状態は用いる脂質の特徴に大きく依存することを利用し、紫外可視吸収、可視円二色性 (CD) スペクトル、過渡吸収スペクトルにより二成分系混合膜における bR の分配挙動を調べた。

【実験】部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC および F8-DMPC は既報<sup>[2]</sup>に基づき合成したものを、DMPC は Avanti Polar Lipids 社製のものをそのまま用いた。部分フッ素化リン脂質 F8-DMPC と DMPC との相溶性は、二成分の混合比を変化させた種々の脂質懸濁液の示差走査熱量測定 (DSC) を行い、観測した吸熱ピークを用いて作成した相図を解析することにより評価した。膜タンパク質である bR の二成分系混合膜への再構成は既報<sup>[2]</sup>に従って行い、約 7 割の高い収率での再構成に成功した。再構成 bR の紫外可視吸収スペクトル、可視 CD スペクトルの測定には、そ

それぞれ Beckmann DU-7500、JASCO J-820 を用いた。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・減衰挙動を調べた。混合脂質膜懸濁液の DSC 測定には、TA インストルメンツ社 Nano DSC を用いた。

【結果と考察】F8-DMPC と DMPC を種々のモル比で混合した二成分系膜の DSC 測定を行った結果、いずれの混合比においても、24 °C 付近と 60 °C 付近に独立したシャープな吸熱ピークが見られた。吸熱ピークが観測された温度は、DMPC、F8-DMPC のそれぞれの純粋な脂質膜懸濁液のゲル-液晶相転移温度にほぼ一致しており、このことは、F8-DMPC/DMPC 二成分系混合膜においてそれぞれの脂質に富むドメインに強く相分離していることを示唆していると考えられる。これらの挙動は、F4-DMPC/DMPC 二成分系では低温側の F4-DMPC 由来の吸熱ピークおよび高温側の DMPC 由来の転移温度が混合比率によりシフトすることと対照的であり、長い Rf 基の導入により混合脂質膜における相分離がより強くなると考えられる。

相分離した二成分系混合膜に再構成した bR の分配挙動を、紫外可視吸収スペクトルおよび可視 CD スペクトルにより調べた。DMPC に再構成した bR (以下 bR/DMPC) の吸収極大波長は天然紫膜に比べ長波長シフトし 570 nm に観測されるのに対し、F4-DMPC 脂質膜中の bR (以下 bR/F4-DMPC) では 560 nm へ短波長シフトするが、当モル比で混合した二成分系膜中の bR (以下 bR/F4-DMPC/DMPC) では 560 nm に吸収極大が観測された。このことは、二成分系混合膜では、bR は DMPC に富むドメインに優先的に再構成されることを示していると考えられる。さらに bR の分子集合状態を調べるため bR/F4-DMPC/DMPC の可視 CD スペクトル測定を行った結果、5 °C では正の極大ピークと負の極小ピークからなる三量体に特有なパターンを示したのに対し、30 °C では単量体に特徴的なブロードな正のピークが観測された (Figure 2)。bR/DMPC と bR/F4-DMPC の CD スペクトルの温度変化は著しく異なる (Figure 2) ことがわかっており、F4-DMPC/DMPC 混合膜中の bR の挙動は bR/DMPC によく一致していることから、極大吸収波長から示されたように、bR が DMPC ドメインに存在していると考えられる。次に、より強く相分離していると考えられる F8-DMPC/DMPC 二成分系混合膜へ bR を再構成し、紫外可視吸収スペクトルおよび可視 CD スペクトル測定を行った。その結果、bR/F8-DMPC/DMPC の吸収極大波長は bR/DMPC のそれとほぼ同じ 560 nm に観測された。また可視 CD スペクトルの温度変化は、F4-DMPC/DMPC 混合膜の場合と同様に、DMPC のゲル-液晶相転移に伴う三量体の単量体への解離を示した。以上の結果から、F8-DMPC/DMPC 混合膜においても bR は DMPC に富むドメインに優先的に再構成されることが示された。過渡吸収による機能中間体の解析結果と共に bR の分配挙動を議論する予定である。

#### 【参考文献】

- [1] H. Takahashi et al., *Chem. Phys. Lett.*, **559** (2013) 107-111.
- [2] M. Yoshino et al., *J. Phys. Chem. B*, **117** (2013) 5422-5429.

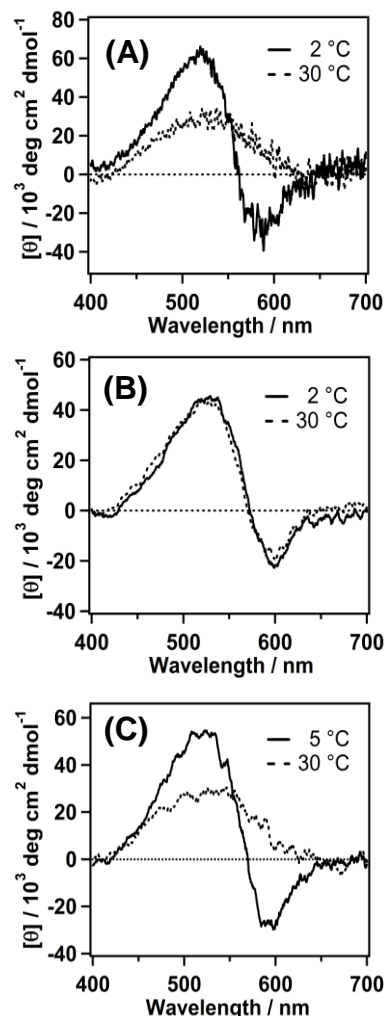


Figure 2. Visible CD spectra of reconstituted in (A) F4-DMPC/DMPC, (B) F4-DMPC and (C) DMPC