

## 論文の内容の要旨

論文題目 Studies on Bicelles as a Model Membrane System for Reconstitution of Membrane Proteins

(膜タンパク質再構成系を指向した生体膜モデルとしてのバイセルに関する研究)

氏名 佐々木 啓孝

膜タンパク質は全タンパク質の約 1/3 を占め、シグナル伝達などの媒体として生命活動に深く関与し、その分子レベルでの機能解析は非常に大きな意義を持つ。本来であれば細胞膜に発現している膜タンパク質の機能を直接解析するのが理想的であるが、細胞膜は他の膜タンパク質を含む多くの構成成分から成る。従って目的とする膜タンパク質の機能についての純粋な知見を得ることは困難であり、より単純化された系への再構成が必須である。しかしながら生体膜中以外の条件下では、膜タンパク質の高い疎水性に由来する活性消失という困難が膜タンパク質機能研究の進展を阻んでいる。その解決策としてベシクルやミセルといった脂質成分（または脂質疑似成分）から成る生体膜モデルに対して膜タンパク質を再構成する手法が広く用いられてきたが、集合体のサイズが大きいことから磁場中での短い回転相関時間が要求される溶液 NMR 分光に適さない、二重膜構造が欠如している可溶化状態で高次構造が異なるなど、各々の形状に由来する様々な欠点が指摘されている。一方、バイセルは脂質二重膜を構成するリン脂質と二重膜の端を覆う界面活性剤を特定の割合で混合することで形成されるディスク状分子集合体であり（図 1）、磁場配向の性質を利用して共存する溶質分子を配向させ NMR によって磁気異方的情報を抽出することに従来用いられてきた。最近の研究においてバイセルはその平面構造が最も小さな生体膜モデルとして考えられベシクルやミセルで見られた欠点を克服する特徴を有すると期待されているが、その応用例は非常に少なく検討すべき課題が多く残されている。筆者は生体膜

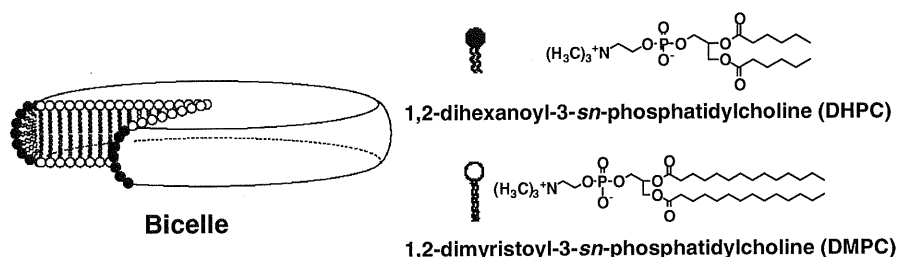


図1 バイセルの模式図

作動性チャネル形成ペプチドとして知られるメリチンをプローブとして、生体膜モデルとしてのバイセルの物性を調べた。さらに膜タンパク質であるバクテリオロドプシンをバイセル中に再構成して膜タンパク質再構成系としての評価も行なった。

### 1. 生体膜モデルとしてのバイセル

#### メリチンによるバイセルの状態変化

$^{31}\text{P}$  NMR を指標としてメリチンの添加に伴うバイセルの状態変化を観測した結果、バイセルは生体膜やベシクルと同様に膜構造崩壊が誘起される事が明らかとなった

(図 2A)。さらに  $^{31}\text{P}$  NMR および動的光散乱を用いて膜構造崩壊後のバイセルの状態変化を観測した結果、膜融合に起因する巨大な球状分子の形成が確認された。続いて

バイセル共存下でのメリチンの構造情報を NMR によって得ることを試みた。メリチンとバイセルの共存系を

考える場合、バイセルが保持されている状態と崩壊している状態が考えられる。膜構造の不安定性から測定下限濃度のメリチンをバイセルと共存させることは実現不可能であったが (図 2A)、コレステロール添加で約 10 倍の安定化が実現されバイセル系中でのメリチンの構造情報取得が可能となった (図 2B)。

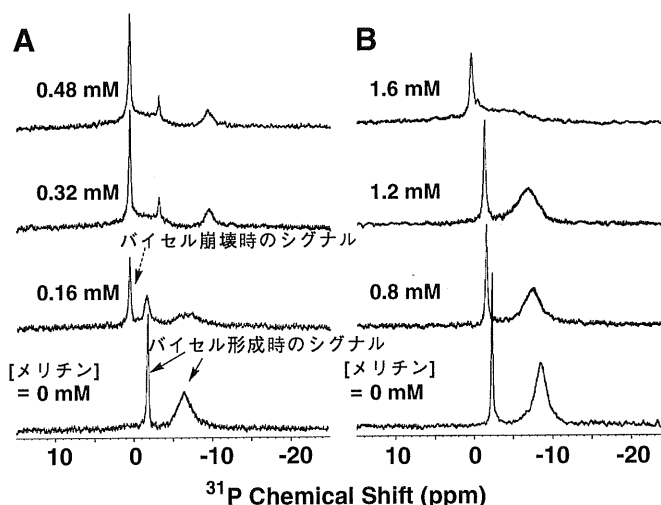


図2 メリチンの添加に伴う  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルの変化

A: コレステロール非含有バイセル

B: コレステロール含有バイセル

#### メリチンのバイセル系中での状態

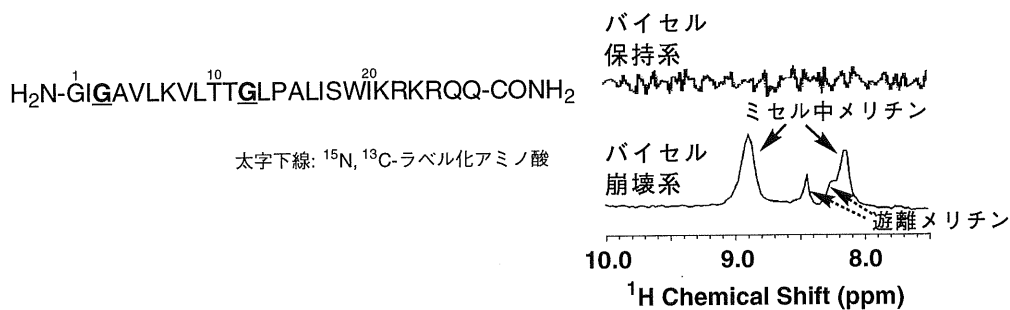


図3 部位特異的ラベル化メリチン（左）を用いた各生体膜モデル中での1D-HSQC スペクトル（観測可能なシグナルはラベル化したGlyのアミドプロトン由来）  
両系中においていずれも[メリチン]=0.6 mM

コレステロール添加の有無により同一のメリチン濃度下でバイセル保持および崩壊系を作ることができるようになったので、これら二つの系におけるメリチンの状態の比較を NMR を用いて行なった。NMR シグナルの感度向上のために部位特異的同位体標識メリチンを固相合成し、両系における HSQC スペクトルの測定を行なった。バイセル崩壊系においてはミセル中および遊離メリチン由来と推定されるシグナルを観測することができたのに対してバイセル保持系のメリチンからは明瞭なシグナルが確認されなかったことから、バイセルの膜構造が保たれている場合、メリチンがバイセルに対して貫入した強い結合状態にあると結論した（図 3）。すなわち、コレステロール含有バイセルを用いることによって初めて NMR スペクトル上でバイセルの二重膜に対するメリチンの配向情報を取得した。

## 2. 膜タンパク質再構成系としてのバイセル

メリチンの実験によってバイセルが膜親和性ペプチドに対しての有用な生体膜モデルであることを証明したので、次に膜タンパク質への応用を試みた。すなわちバクテリオロドプシンをコレステロール含有バイセル中に再構成し、その性質を紫外可視分光を用いて評価した。ミセル中とバイセル中のバクテリオロドプシンの比較を行なった結果、バイセル中における吸収極大がミセル中に比べて長波長側にシフトし、古細菌の細胞膜である紫膜中での吸収極大波長にほぼ一致する結果を得た（図 4）。両生体膜モデル中での脂質分子の脂肪鎖近傍でのパッキングの相違が再構成されたバクテリオロドプシンの性質に影響

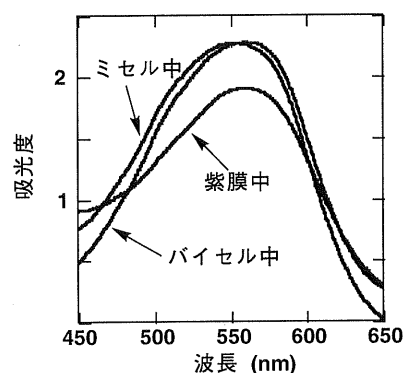


図4 バクテリオロドプシンの紫外可視領域吸収スペクトル

を与えたと考察し、ピレン導入脂質蛍光プローブを用いてパッキングの比較を行なった。ピレンのモノマーに対するエキサイマーのピーク強度比は温度に対して次式で表されるが、

$$I_E/I_M = BP(T)T \exp(-E_a/RT)$$

$I_E$ : エキサイマー由来ピーク強度  
 $I_M$ : エキサイマー由来ピーク強度  
 $B$ : 定数  $P(T)$ : 立体因子(パッキングに関連)  
 $T$ : 温度  $R$ : 気体定数  
 $E_a$ : エキサイマー形成時の活性化エネルギー  
 式1

観測結果に対し Arrhenius プロットをとったところ直線回帰に良い一致を示した事から(図5)、

$$P(T) = P_0 \exp(D/T) \quad P_0, D: \text{定数}$$

式2

と近似され、それぞれの回帰直線の傾きおよび切片の値からバイセルがミセルよりもパッキングの度合いが5~9%減少していることが明らかとなった。すなわち紫外可視分光の実験結果と併せれば、バイセル形成に伴うバクテリオロドプシンの性質の変化は脂質分子間のパッキングが減少してタンパク質分子が本来の三次元構造をとることを許容したことに由来すると判断した。

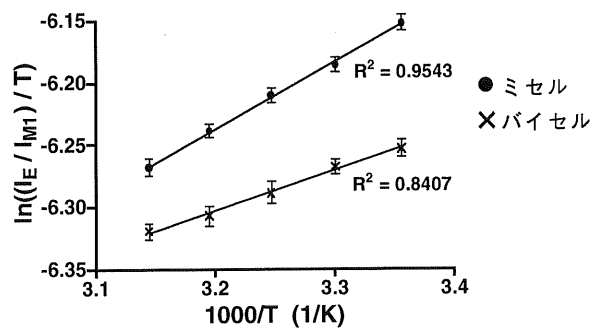


図5 ピレンのエキサイマー/モノマーピーク強度比に対する Arrhenius プロット  $T = 298 \text{ K} \sim 318 \text{ K}$

以上筆者はバイセルがメリチンに対して生体膜と同様の環境を与え、生体膜モデルとして有用であることを明らかにした。その過程で膜構造の不安定性が問題となったが、コレステロールを添加することによって解消できることを見出した。さらにバイセル中に再構成したバクテリオロドプシンの性質を解析した結果、膜タンパク質再構成系としてもバイセルが有効であるという知見を得た。