

学 位 論 文 の 要 旨

新規部分フッ素化リン脂質二分子膜中の膜タンパク質に関する物理化学的研究 (Physicochemical Studies of Membrane Protein in Novel Partially Fluorinated Phospholipid Bilayer)

氏 名 吉野 賢 印

近年の様々な生物種のゲノム解析により、ほとんど全ての生物種においてオープンリーディングフレーム (ORF) のおよそ4分の1が膜タンパク質をコードしていると考えられており、基礎生命科学および創薬への応用の観点から、膜タンパク質研究はますます注目を集めている。しかしながら、従来の界面活性剤および脂質を用いた *in vitro* における膜タンパク質の実験が非常に困難であるため、分子レベルの膜タンパク質に関する知見は極めて限られている。本研究では、膜タンパク質の機能・構造の解析を行う基盤技術の確立を目指して、アシル鎖の末端ブチル基をフッ素化した新規部分フッ素化リン脂質 1,2-dinonafluorotetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC)を用いて、脂質膜の物理化学的性質の解析および脂質膜に再構成した膜タンパク質の構造・機能の解析を行った。

2章では、種々の物理化学的計測法を用いて、先ず脂質膜の物性について検討した。示差走査熱量測定 (DSC) および広角 X 線回折測定により脂質二分子膜の相転移挙動を調べた結果、F4-DMPC のゲル-液晶相転移温度 (T_m) が 5.4°C であることを明らかにした。また、水面上の F4-DMPC 単分子膜の表面圧-分子面積等温曲線の測定を行ったところ、DMPC に比べて高い崩壊圧を示し、より安定な膜を形成することが示唆された。さらに、環境応答性蛍光色素 LAURDAN を混合した脂質膜の蛍光測定から、非フッ素化リン脂質 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DMPC)に比べて、ゲル相において疎水性・親水性界面領域の極性が高く、相転移後は DMPC と同等であることがわかった。以上のことから、アシル鎖末端にフッ素原子を導入した部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC は、非フッ素化リン脂質とは異なる部分フッ素化による際だった性質を示すことを明らかにした。

3章では、部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC と非フッ素化リン脂質 DMPC の混合挙動について、混合脂質膜の DSC と X 線回折の実験結果から検討した。DSC 測定から得られた T_m を基に作成した F4-DMPC/DMPC 混合膜の相図は、相溶性ギャップをもつ共晶

型のタイプであることが明らかになった。さらに正則溶液理論を用いて相図を解析することにより得られる非理想混合パラメータの値は比較的大きく、混合脂質膜ではそれぞれの脂質に富むドメインを形成する傾向が強いことがわかった。この F4-DMPC/DMPC 混合膜における相分離挙動は、混合脂質膜の X 線回折において、それぞれの脂質のみからなる脂質膜で観測される回折ピークに類似したパターンが顕著に見られることから支持された。

4 章では、膜タンパク質研究のための材料として、部分的にフッ素化されたリン脂質の膜特性が膜タンパク質にどのような影響を及ぼすのか調べるため、F4-DMPC のリポソームへの膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) の再構成を試みた。さらに得られた再構成試料の特徴を主として分光学的手法を用いて検討し、対応する非フッ素化リン脂質 DMPC で再構成した bR の場合との比較を行った。その結果、ゲル相における F4-DMPC 再構成膜中の bR 分子は、天然紫膜と同様に、三量体を基本とする二次元結晶構造を形成すること、および天然紫膜類似の光サイクルを有することを明らかにした。F4-DMPC 二分子膜中の bR は、液晶相においても天然紫膜類似の構造や機能を有し、また可視光に対して高い安定性を示したことは、非フッ素化リン脂質 DMPC 中の bR が、液晶相では三量体から単量体への解離が生じ、可視光照射によって不可逆的変性が液晶相において誘起されることとは対照的であった。

5 章では、4 章で述べた、部分フッ素化リン脂質へ再構成した bR が液晶相においても二次元結晶構造を保持するという際だった性質の原因を探るため、3 章で相分離挙動を明らかにした DMPC/F4-DMPC 混合膜に bR を再構成し、その分配挙動を検討した。その結果、液晶相にある混合膜中において、bR は非フッ素化リン脂質 DMPC に富むドメインに優先的に再構成され、単量体に解離することがわかった。このことは、部分フッ素化リン脂質は bR と混ざりにくい性質をもつことを示しており、液晶相部分フッ素化リン脂質膜中における膜タンパク質集合体形成の駆動力の 1 つとなっていることが示唆された。

以上の結果から、本研究で用いた新規部分フッ素化リン脂質は、非フッ素化リン脂質からなる脂質膜では見られない際立った性質を示すことが明らかになった。また、膜タンパク質を再構成し、*in vitro* で構造や機能の解析を行うためのマトリックスとしても有用であることが示された。近年膜タンパク質研究において、部分フッ素化界面活性剤の有用性が報告されていることも併せ考えると、今後、部分フッ素化リン脂質が膜タンパク質研究において役立つことが期待される。

Recent genome sequence analyses showed that membrane proteins are encoded by ~25% of the total open reading frames (ORFs) and are attracting much more attention in the fields of pharmaceutical and biomedical sciences as well as fundamental bioscience. Due to serious difficulties in experiments *in vitro* with conventional surfactants and lipids, however, a limited number of experimental data of membrane proteins at the molecular level are available to date. To overcome the difficulties and establish a new elemental technology for *in vitro* studies of membrane proteins, a novel partially fluorinated phospholipid, 1,2-dinonafluorotetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (F4-DMPC), which is an analog of a common 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) with the perfluorinated butyl segment in the myristoyl group, was employed for structural and functional analyses of membrane proteins embedded in phospholipid bilayer.

In Chapter 2, membrane properties of F4-DMPC were investigated by using several physicochemical techniques. Differential scanning calorimetry (DSC) and temperature-dependent wide-angle X-ray diffraction (XRD) measurements of hydrated F4-DMPC bilayer demonstrated that the thermotropic transition from the gel phase to the liquid-crystalline phase occurred at 5.4 °C. It was shown from the comparison of the surface pressure-molecular area isotherms for monolayer on water surface between F4-DMPC and DMPC, F4-DMPC monolayer is physically more stable than DMPC at 30 °C. Furthermore, the polarity around the hydrophilic/hydrophobic interface region of bilayer lipid membrane was probed by a polarity-sensitive fluorescent LAURDAN, which revealed that in the gel phase, the hydrophilic/hydrophobic interface region of F4-DMPC is more hydrophilic than DMPC, while the polarity in the interface of F4-DMPC bilayer is comparable to that of DMPC.

In Chapter 3, the mixing behavior of hydrated F4-DMPC and DMPC bilayer was studied with DSC and XRD techniques. The analysis of the DSC data by using the regular solution theory revealed that the phase diagram of the binary mixtures is a eutectic type with a miscibility gap. The large non-ideality parameters of the gel and liquid-crystalline phases, which are estimated from the phase diagram, indicate that in the binary bilayer, a phase separation to the DMPC-rich and F4-DMPC-rich domains occurs. The phase separation in the binary systems was strongly supported by the comparison of the XRD patterns between the binary mixtures and the pure bilayer.

In Chapter 4, reconstitution of a membrane protein bacteriorhodopsin (bR) into F4-DMPC liposome was attempted, in order to examine effects of partial fluorination of phospholipids on structure and function of membrane proteins. Successful preparation of bR/F4-DMPC proteoliposome was accomplished with high yields. Visible circular dichroism (CD) and XRD diffraction patterns of bR/F4-DMPC proteoliposome demonstrated that in the gel phase, the reconstituted bR molecules adopt the two-dimensional lattice structure of trimers as the structural

unit like the native purple membrane. Laser flush-induced transient absorption changes of the proteoliposome showed that the reconstituted bR has a photocycle very similar to bR in the native purple membrane. Even in the liquid-crystalline phase, bR embedded in F4-DMPC liposome showed the native-like higher-order structure and higher stability against visible light, which strikingly contrasts with lipid phase transition-induced disaggregation of protein molecules and light-induced denaturation in DMPC liposome.

In Chapter 5, distribution behaviors of bR molecules in the phase-separated binary F4-DMPC/DMPC bilayer, which is mentioned in Chapter 3, were investigated by UV-visible absorption and visible CD, in order to address what is responsible for the native-like higher order structure even in the liquid crystalline phase, which is stated in Chapter 4. Spectroscopic data showed that in the binary systems, bR molecules were preferentially reconstituted into DMPC-rich domains in the monomeric state, indicating that the partially fluorinated phospholipid F4-DMPC has low miscibility with bR molecules. One of the most plausible driving force for assembly of membrane proteins in the liquid crystalline phase is that bR molecules have the tendency to be immiscible with F4-DMPC.

In summary, the novel partially fluorinated phospholipid F4-DMPC exhibited membrane properties significantly different from the corresponding un-fluorinated one DMPC. The structurally and functionally native-like and highly stable reconstitution of a membrane protein bacteriorhodopsin into f4-DMPC liposome was accomplished not only in the gel phase but also in the liquid crystalline phase. It is strongly expected that partially fluorinated phospholipids are very powerful for studying membrane proteins *in vitro*.