

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

群馬大学 大学院工学研究科 物質創製工学領域

吉野 賢

目次

第1章 序論

1.1 背景	4
1.2 生体膜.....	7
1.3 膜タンパク質.....	8
1.4 脂質二重膜.....	10
1.5 フッ素化リン脂質.....	13
1.6 バクテリオロドプシン (bR)	17
1.7 研究の目的.....	22
1.8 参考文献.....	23

第2章 リン脂質ジミリストイルホスファチジルコリンのミリストイル基への部分フッ素化による熱及び界面物性への影響

2.1 背景	27
2.2 試料と実験方法.....	30
2.2.1 試料の調製.....	30
2.2.2 測定方法.....	31
2.3 結果と考察.....	33
2.4 総論.....	39
2.5 参考文献.....	40

第3章 部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC と非フッ素化リン脂質 DMPC の親和性の評価

3.1 序論	43
3.2 試料と実験方法	45
3.2.1 試料の調製	45
3.2.2 測定方法	46
3.3 結果と考察	47
3.4 総論	58
3.5 参考文献	59

第4章 部分フッ素化ホスファチジルコリン F4-DMPC に再構成されたバクテリオロドプ

シンの物理化学的解析

4.1 背景	62
4.2 試料と実験方法	64
4.2.1 試料の調製	64
4.2.2 測定方法	65
4.3 結果と考察	69
4.4 総論	81
4.5 参考文献	82

第5章 部分フッ素化リン脂質と非フッ素化リン脂質からなる二成分リポソームにおける 膜タンパク質バクテリオロドプシンの局在性	
5.1 背景	85
5.2 試料と実験方法	86
5.2.1 試料の調製	86
5.2.2 測定方法	86
5.3 結果と考察	87
5.4 総論	103
5.5 参考文献	104
第6章 結論	106
謝辞	110

第1章 序論

1.1 背景

膜タンパク質は様々な生物の細胞内の生体膜の最も基本的な構成成分の一つである。近年のゲノム解析の結果より、膜タンパク質は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）の約25~30%でコードしていると考えられており、ゲノム計画の進展に伴い、基礎的なバイオサイエンスや創薬への応用の観点より膜タンパク質研究はますます注目を集めている。¹⁻⁴ 特に膜タンパク質の大量発現技術は著しく進歩しており、遺伝子発現系が構築される膜タンパク質の構造・機能解析に対応するために、*in vitro*での膜タンパク質再構成系を用いた研究基盤の確立が期待されている。また膜タンパク質の機能場である生体膜に関して、従来の流動モザイクモデルに加えて脂質膜ドメインの存在が報告され、生物物理学などの分野で注目を集めている。天然の生体膜中に膜タンパク質を含む生体分子集合体としての脂質膜ドメインが見出された実験事実は、膜タンパク質の構造・機能・物性の本質的な理解のために、機能場としての脂質二重膜の特徴や役割を分子レベルで研究することの重要性、必要性を改めて強く示すものであり、脂質・タンパク質相互作用の観点からの膜タンパク質研究が強く望まれている。しかしながら、膜タンパク質の構造形成、機能発現、物性に対する脂質分子の役割に関する詳細はほとんどわかっていない。

膜タンパク質は親水性、疎水性の2つの領域を有し、両親媒性を示す。膜タンパク質の単離、精製及びさらなる生化学的および生物物理学的研究において、界面活性剤およびリン脂質のような両親媒性分子は、膜タンパク質の機能的形態を保つために重要な役割を担う。しかしながら、従来の界面活性剤および脂質を用いた水中での膜タンパク質の取り扱いが非常に困難であるため、膜タンパク質の三次元構造の実験データはこれまで水溶性タンパク質とは対照的に非常に限られている。⁵ この困難を克服し、膜タンパク質の機能、構造および動態のさらなる分析をおこなうために、適切な環境で膜タンパク質を調製する新たな界面活性剤および脂質の設計および合成は、長い間望まれてきた。⁶

そこで最も有望なアプローチの1つとして、両親媒性分子中のフッ素原子による水素原子の置換に着目した。疎水性尾部にフッ素原子を導入することにより、非フッ素化分子とは著しく異なる物理的性質を持つため、ミセルおよび二重膜などの分子集合体の形成時に膜タンパク質と天然の脂質分子との、より強い剛性およびより弱い相互作用が生じる。膜タンパク質研究のためのフッ素化界面活性剤は、1990年代にいくつかのグループによって初めて開発された。⁷⁻¹¹ 特に、末端が水素化されたフッ化炭化水素鎖を有する界面活性剤であるヘミフルオロ化界面活性剤（HFS）は、もともと Popot と Pucci の協力によって開発されたもので、フッ素化界面活性剤の全体的な疎液性を維持しながら、HFSは膜タンパク質の膜貫通表面との相互作用を改善することができるため、膜タンパク質研究に利用された。¹⁰⁻¹³ 一方、Riess や Vierling および共同研究者による薬物送達システムに適用可能な高度に安定なリポソームの材料として最初に開発されたフッ素化脂質は、主に物理化学

の分野で注目を集めている。¹⁴⁻²³ これまでの物理化学的研究は、部分的にフッ素化された脂質膜に特有の非常にユニークな特性を示し、例えば末端フッ素化セグメントにより、高い熱安定性、高い透過性、剛直効果が得られた。しかしながら、膜タンパク質を組み込むための材料として部分フッ素化脂質を利用する試みはこれまでに報告されていない。

1.2 生体膜

生体膜は原核細胞と真核細胞、植物と動物におけるすべての細胞の構造と機能において中心的な役割を果たしている。生体膜は組織だった構造を持つシート状の集合体で、この主成分はタンパク質と脂質である。膜は生物の細胞の構造と機能において非常に重要な二つの役割を担っている。それは膜を構成する脂質分子が担う、内部環境と外部環境から隔離することと、細胞内外の情報伝達を調整することである。これには2つの区画（内と外）間でのイオンや分子の移動が起こる場合もあるし、膜成分の構造変化をともなう場合もある。²⁴

原核細胞の DNA 複製、タンパク質合成、タンパク質分泌、エネルギー生産やホルモン作用などのように多様な基本的な細胞機能の大部分には、なんらかの形で膜が関与している。膜には特異的なチャネルが存在しており、すべての物質を通過させるわけではなく、極めて選択的な透過性を備えた障壁となっている。これらのチャネルは膜タンパク質という生体分子がその役目を担っている。図 1.2.1 に生体膜モデルを示す。

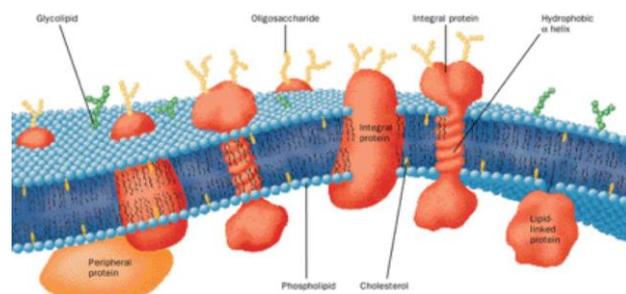


図 1.2.1 生体膜²⁵

1.3 膜タンパク質

膜の担う機能の極めて重要な部分、あるいは膜の上で進行する重要な反応は、膜に存在する膜タンパク質によって行われる。膜タンパク質は生体膜の活性部分であり、輸送体や受容体、小孔などに対応している。膜タンパク質には大きく分けて二種類あることが知られている。一つは膜の表面に結合した、表在性タンパク質と、もう一つは膜の脂質二重膜に埋め込まれた、内在性タンパク質である。(図 1.3.1)

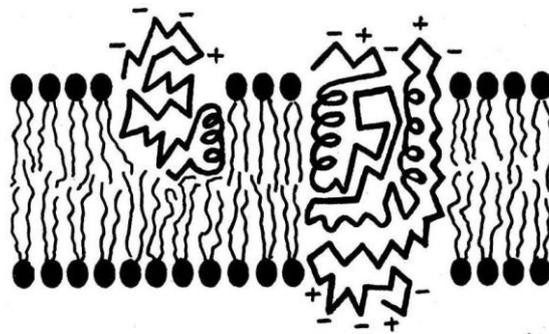


図 1.3.1 表在性 (左)、内在性 (右) 膜タンパク質²⁴

表在性タンパク質は、膜脂質の極性部分または他の膜タンパク質との相互作用によって膜表面に結合しており、膜をイオン強度、酸やアルカリ性 pH あるいは EDTA のようなキレート剤を含む緩衝液で洗浄することによって遊離する。このようなタンパク質は静電相互作用により膜脂質やタンパク質とゆるやかに結合していると考えられる。これらの試薬はタンパク質間の相互作用は破壊するが、タンパク質を変性させない。

これに対して内在性タンパク質は膜の脂質に埋め込まれ、脂肪酸側鎖やコレステロールに囲まれている。内在性膜タンパク質は分子内に疎水性領域を持っており、膜脂質の疎水

性領域と強く相互作用しているため、界面活性剤や有機溶剤を用いて遊離する。界面活性剤は脂質二重膜および脂質とタンパク質間の疎水結合を破壊する。この効果から膜タンパク質は界面活性剤により可溶化の分散状態をとることができる。界面活性剤を除去するとタンパク質の凝集や沈殿が生じる。

膜タンパク質は存在環境の影響を大きく受け、pH や温度はもちろん、収まる膜の流動性などによってその構造および集合状態を大きく変化させる。膜タンパク質は結晶化のしにくさなどの問題から、その構造や機能のメカニズムが明らかになっていないものばかりである。²⁴

1.4 脂質二重膜

脂質二重膜は生体膜の基本構造であり、その主な構成成分はリン脂質からなっており、その他は糖脂質やコレステロールなどが含まれる。脂質二重膜は疎水力により安定化され、この力により水と非極性アシル鎖との接触表面積が最小となるような構造が形成される。水和と脂質間の水素結合を含む極性頭部領域内の分子間相互作用も重要である。^{26,27}

一般にリン脂質を 50% 以上の水、塩類溶液などにさらすと、自動的にスメクチック液晶と呼ばれるような二重膜よりなる閉鎖小胞を形成する。電子顕微鏡でネガティブ染色や薄膜切片をつくってみると、多重の同心円状のラメラ構造が観測される。さらに超音波処理を行うと多重構造は見られなくなり、1 枚の脂質二重膜で出来ている小胞 (single compartment vesicle) が出来る。多重のラメラからなる小胞、一重のラメラからなる小胞を含めて、リポソーム (liposome)、lipid vesicle、smectic mesophase、lipid spherules、banghasome と様々に呼ばれている。²⁸⁻³¹

リン脂質などの極性物質は、脂質-水の混合系において 1 種類以上の安定した構造 (相) を形成する。この際どのような相をとるかは、脂質濃度、温度、圧力、イオン強度、pH などのパラメータによって決定する。これは極性基の水和力による親水的相互作用と通常 2 本の炭化水素鎖を持つ疎水基の疎水的相互作用による強い両親媒性の性質に起因して、脂質分子が自己凝集する結果である。脂質二重膜を温度変化させることにより、異なるい

くつかの会合状態の間の相転移現象が生じる。代表的なリン脂質膜は、以下のような相を形成する。³²

1. 結晶相 (L_c 相)

極性基が固く結合し、炭化水素鎖はオールトランス状態で、分子軸は膜に対して傾いている。この相への結晶化速度は他の相に比べ極めて小さい。

2. ゲル相 (L_β 相)

極性基は比較的動きやすく、分子軸の傾斜は液晶相に比べて小さい。(傾斜が無く、垂直なものを L_β 相という。)

3. リップル相 (P_β 相)

極性基はゲル相よりもさらに動きやすく、ラメラ面に垂直な方向に数Åの振幅を持ち、波長が 130~150Åの波うち構造にある。このリップル周期は水和状態により変化するが、温度変化は少ない。

4. 液晶相 (L_α 相)

アシル鎖は融解し、脂質同士間の結晶構造が消失する。脂質分子の流動性(側方拡散や極性基の回転)が増大している。生体膜のほとんどが液晶相の状態にある。

リン脂質の鎖長を変えると、各相の転移温度が変化する。一般的に結晶相からゲル相への転移(副転移)温度はあまり変化しないが、ゲル相からリップス相への転移(前転移)

温度とリップル相から液晶相への転移（主転移）温度は鎖長が長くなるにつれて上昇する傾向にある。

1.5 フッ素化リン脂質

石鹼や脂質などに代表される界面活性剤のほとんどは炭化水素鎖を疎水鎖とするが、フッ化炭素鎖を疎水鎖とする含フッ素界面活性物質は、研究開発の歴史は浅いものの、界面物性で際立った性能を示す“super surfactant”として当初より注目されてきた。³³

例えば、C-F 結合 (CF_4 の場合、1 結合当たり 129kcal/mol) は C-H 結合 (CH_4 の場合、同じく 104kcal/mol) より安定であることから、含フッ素界面活性物質の耐熱性、耐薬品性 (耐酸・耐アルカリ性・耐酸化・耐還元性など) は、炭化水素系界面活性物質のそれに比べはるかに高い。また、F 原子自体は原子量の割に原子半径が小さく (van der Waals 半径は H 原子の 1.22 倍、C-F 結合距離は C-H 結合の 1.28 倍)、極めて分極し難い (低分極率) という特徴がある。このため、引力的分子間相互作用 (凝集力) が弱くなり、含フッ素界面活性物質自身やその水溶液、あるいは非水溶液の表面張力 (表面エネルギー) を大きく低下させることも知られている。³⁴

水溶液の場合、炭化水素系界面活性物質の示す表面張力低下能の到達限界を超え、20mN/m を下回る張力に低下させ得るものもある。さらに、炭化水素との分子間相互作用も乏しいため、高疎水性のみならず高疎油性を示す性質がある。このような含フッ素界面活性物質の特徴から、工業分野においては、撥水・撥油剤、起泡・消泡剤、潤滑油、分散剤、あるいは剥離剤などとして、幅広く利用されてきた。

これに加えて、F 原子導入が生理活性分子の活性を変え得ることも知られるようになり、医療・バイオ分野での F 原子導入分子の利用も進んでいる。実際、現在の医薬品・農薬分野における開発品の 3 割は、なんらかの形で F 原子が導入されているという。例えば、医療分野での含フッ素界面活性物質の応用として古くから知られるのが、酸素溶解度の高いフルオロカーボンと含フッ素界面活性剤から調製されるエマルジョンを代替血液として利用するものである。また、同様のエマルジョンは、超音波造影剤や MRI 造影剤などとして、虚血診断やがん組織の診断に利用されている。

一方、バイオ分野ではプロテオミクス研究がポストゲノム時代の一端を担う現在、未知タンパク質の立体構造解析は一大テーマとなっている。可溶性タンパク質に比べて、三元結晶の作製が極めて困難な膜タンパク質の場合、界面活性剤の様々な分子集合構造を結晶化場とした方法が有効とされ、特に含フッ素脂質単分子膜が、タンパク質可溶化剤である凡用界面活性剤の侵襲を受け難いため、可溶化タンパク質の結晶化場に適すると期待された。通常の界面活性剤とは対照的に、含フッ素界面活性剤が多岐にわたって生体分子・生体内へ適用が可能なのは、前述のように含フッ素界面活性剤と炭化水素などとの分子間相互作用が弱い、すなわち生体分子に対する作用が不活性 (biologically inert) で、細胞や組織への毒性が低いということが大きい。このような特徴から、含フッ素界面活性剤は、人工血管材料の表面修復剤やリポソーム DDS 材料、臨床診断用細胞分散剤などとしての研究も展開され、医療・バイオ分野における含フッ素界面活性剤の需要はますます高まる観がある。

含フッ素界面活性剤のバイオ分野における有用性は高いが、一方で実用上の問題もある。まず、含フッ素界面活性剤の疎水鎖であるペルフルオロアルキル鎖は、前述のように炭化水素との相互作用が乏しいため、F原子導入量によっては、その溶剤が限定されることが多い。また、ペルフルオロアルキル鎖は内部回転障害が大きいため、剛直な擬 *all-trans* コンホマーをとりやすく、結晶質になりやすい。このため、膜タンパク質の再構成基材として考える場合、F原子導入量が高い疎水鎖では、室温から生理的温度の範囲で、凝縮膜あるいは固体膜状態となり、タンパク質機能の発現に必要な膜流動性に乏しく、再構成基材としては適切ではない。

さらに、高度にフッ素化された疎水鎖の場合、上述のように生体分子との分子間相互作用が乏しく、天然由来の脂質やタンパク質との相溶性が低下して、混合・再構成操作ができない懸念もある。その他、F原子導入にかかる総コストが高いこと、フロン問題と同じく分解物が環境負荷となる側面があることから、可能な限りF原子導入量を抑える必要もある。そのような意味で、完全にフッ素化された疎水鎖よりも、部分的にF原子を導入した疎水鎖が望ましい。^{35,36}

上述したような含フッ素界面活性剤の特徴と実用上の問題を踏まえ、膜タンパク質の再構成基材として部分含フッ素脂質群が適していると考え、本研究では一般によく知られている人工リン脂質、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC; 図 1.5.1) の疎水鎖の末端を部分的にフッ素化した部分フッ素化ジミリスチルホスファチジルコリン (F4-DMPC; 図 1.5.2) を用いて膜タンパク質の再構成研究を行った。

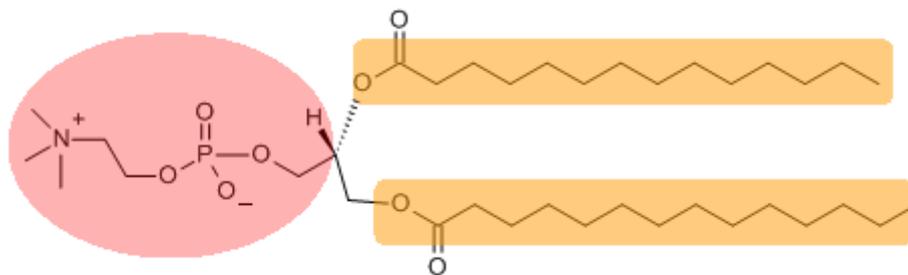


図 1.5.1 ジミリストイルホスファチジルコリン ; DMPC

(1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)

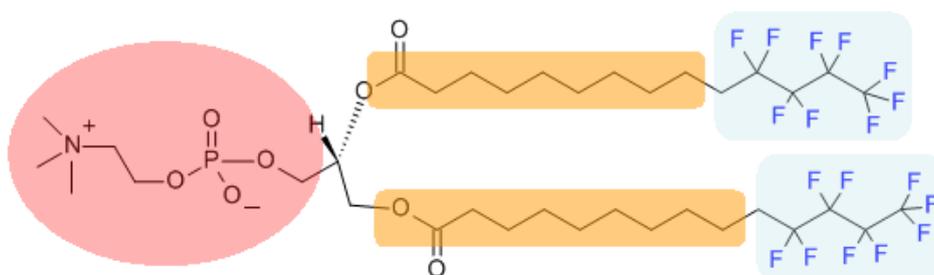


図 1.5.2 部分フッ素化ホスファチジルコリン ; F4-DMPC

(1,2-di(11,11,12,12,13,13,14,14,14-nonafluorotetradecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine)

1.6 バクテリオロドプシン (bR)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜から単離・精製される膜タンパク質で、光駆動プロトンポンプの機能を持つことが知られている。最もよく研究されている膜タンパク質の一つであるため、膜タンパク質のモデル系として用いられる。

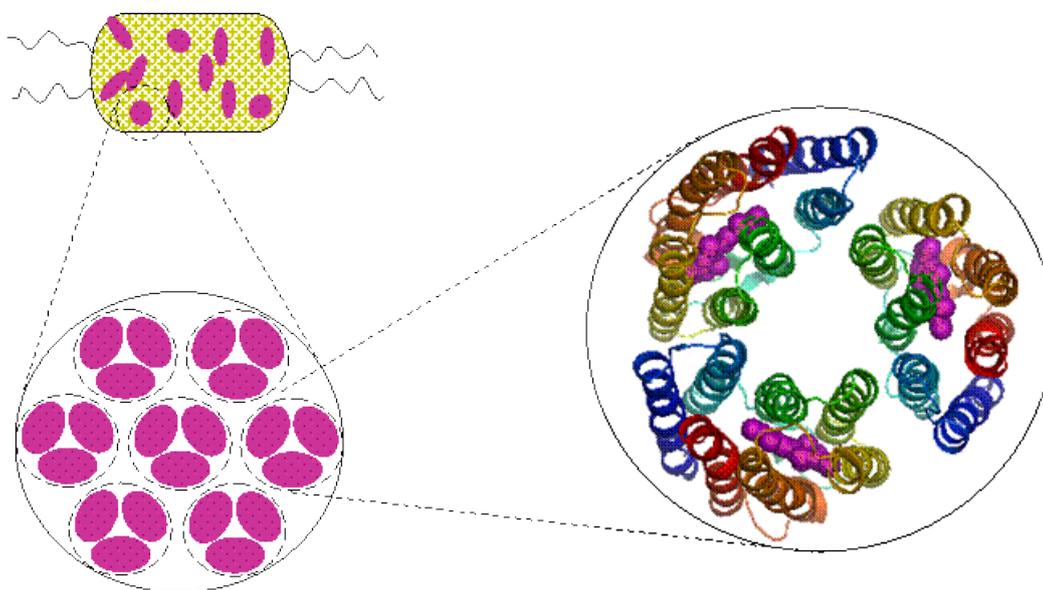


図 1.6.1 高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* と bR

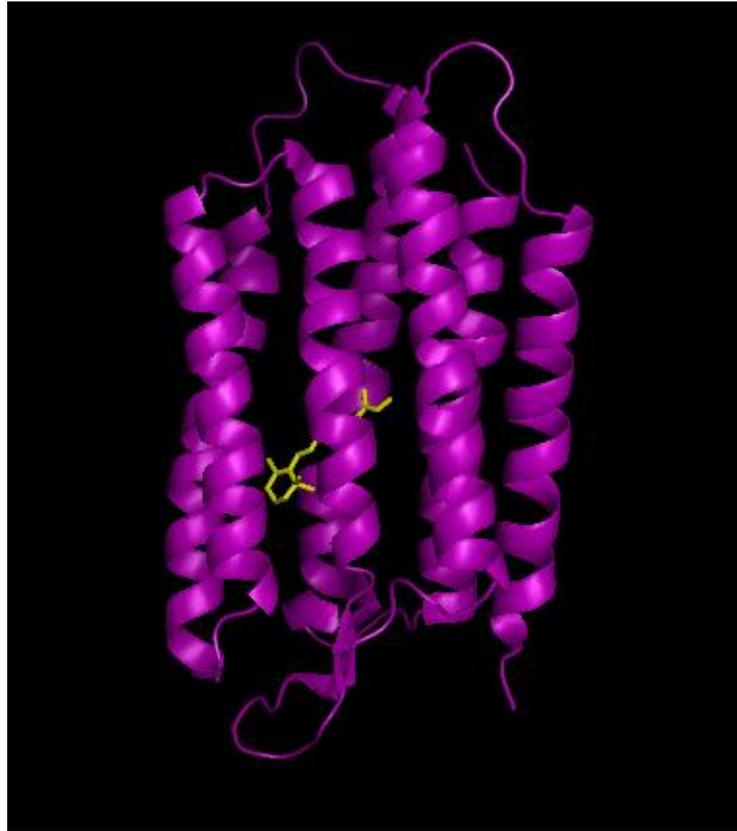


図 1.6.2 bR 1 分子 [PDB:2AT9] (黄色の分子はレチナール)

塩湖などに生息する高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* は、通常酸素呼吸によってエネルギーを作り出す。しかし水面付近の塩濃度が低下すると、濃い塩濃度を求めて塩湖深部に移動する。*Halobacterium salinarum* はこのような嫌気的状况下におかれると細胞膜上に紫色のパッチ（紫膜）を発現させる。紫膜は可視光を吸収し、パッチ内の bR を機能させ、エネルギーを作り出している。紫膜はタンパク質：脂質が 3：1 の重量比で形成されており、膜中に存在するタンパク質は bR のみである。bR は可視光を吸収し、細胞内側から外側へとプロトンを放出する機能を持っており、このプロトンを利用して ATP 合成酵素を機能させてエネルギーを作っている。³⁷⁻⁴¹

bR は分子量 26000、248 アミノ酸残基（約 4000 原子）からなる膜タンパク質で、アポタンパク質バクテリオオプシン（bO）に発色団のレチナールが 216 番目のリジン残基の ϵ アミノ基とプロトン化したシッフ塩基結合（ $-C=NH^+$ ）を介して結合している構造をしている。暗の中では、レチナールが 13-cis,15-syn の構造（bR_D）と、all-trans の構造（BR）が 2：1 の割合で含まれるが、明順応した状態ではほぼすべてが all-trans の構造をとる。bR は膜に 7 本のヘリックスが貫通した内在性膜タンパク質であり、天然状態で三量体を 1 ユニットとした六方格子状の二次元結晶を形成している。

bR は光を吸収することで発色団のレチナール分子が異性化し、光サイクルを起こしてプロトンを膜の内側から外側へ移動させる。この機能を光駆動プロトンポンプという。bR はプロトンポンプタンパク質で唯一、プロトンの輸送機構がわかっているタンパク質である。この機能の詳細な分子メカニズムについて説明する。

bR は美しい紫色をしており、分光器で吸収スペクトルを測ると、570nm 付近に吸収の最大値を持つ。暗の中では吸収のよく似た 2 つの状態（bR_D と BR）をとり、光照射を続けることによってプロトンポンプできる状態（BR）だけになる。BR が光を吸収すると、K、L、M、N、O と名づけられた色の異なる中間体が順次生成する。そして約 10 ミリ秒で元の状態へ戻るまでにプロトンが細胞質側から細胞外側へ輸送される。bR のプロトンポンプ中における各中間体とそれに対する bR の構造変化に関して以下に説明する。また図 1.6.3 にプロトンポンプ機構を示す。

0. 基底状態 → 明順応状態

暗中にはレチナールが 13-*cis*,15-*syn* の構造 (bR_D) と *all-trans* の構造 (BR) が 2 : 1 の割合で含まれる基底状態であるが、明順応した状態ではほぼすべてが *all-trans* の構造をとる。

1. bR → K

明順応状態の bR が光エネルギーを吸収すると、*all-trans* 型のレチナールが 13 *cis*,15-*anti* 型に異性化し、K 中間体が生成する。この間にタンパク質骨格に大きな構造変化はなく、K 中間体は光エネルギーが蓄えられた、熱的に励起された状態である。純粋な光反応はこの過程で完了しており、後の過程でプロトンポンプという仕事は、このエネルギーの緩和によっておこなわれる。

2. K → L

レチナールのゆがみが大きくなり、水分子の強い水素結合が観測される。これはプロトン化したシッフ塩基が bR 分子内に存在する水分子を介して Asp85 と相互作用しているためである。

3. L → M

550nm に吸収極大を持つ L 中間体のシッフ塩基のプロトンを Asp85 に渡すことで、412nm に大きくブルーシフトする。シッフ塩基から Asp85 にプロトンが移動すると即座に Glu204 からプロトンが細胞外に放出され、M 中間体となる。

4. M₁、M₂

M 中間体にはさらに 2 つの中間体が存在し、シッフ塩基が細胞外側に接している M₁ 中間体と、細胞質側からプロトンを取り込む M₂ 中間体が存在する。これらの吸収波長はともに 412nm であり、M₁、M₂ 中間体における構造変化はプロトンを取り込む構造と放出する構造のスイッチのような役割を担っている。

5. M₂ → N

Asp96 からシッフ塩基へプロトンが移動する。シッフ塩基へのプロトンのドナーとなる Asp96 は膜内部の疎水的環境下に存在するので、pK_a 値が 11.6 と極めて高い。プロトン移動するためには pK_a を下げる必要があり、ヘリックス B の変化に続きヘリックス F の細胞質側が開き、Asp96 を親水的な環境にすることでプロトン移動を可能にしているというモデルが広く考えられている。

6. N → O

Asp96 が細胞質側からプロトンを取り込むことで、O 中間体が生成する。レチナールは *all-trans* 型をしており、プロトン化した Asp96、Asp85 と脱プロトン化した Glu204 を持つ。吸収スペクトルが 550nm から 640nm へ大きくレッドシフトすることから識別可能だが、O 中間体が蓄積しにくいことや N 中間体とカイネティクスが似ていることから区別することが難しい。N 中間体の開いていた細胞質側の構造は、O 中間体では基底状態の構造に戻っている。

7. O → bR

プロトン化していた Asp85 から Glu204 へプロトンが移動し、bR は基底状態へと戻る。

このようにプロトンポンプ機能は、a)レチナールの構造変化、b)プロトン結合基の電荷状態の変化、c)タンパク質骨格構造の変化 の三つがそれぞれ巧みに調和しながら達成されている。⁴²⁻⁴⁴

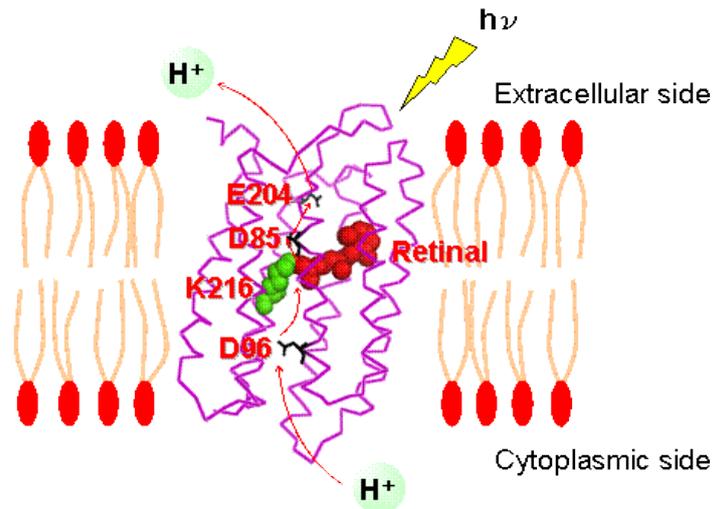


図 1.6.3 プロトンポンプの機構

1.7 研究の目的

本研究では、フッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への応用を目標に、フッ素導入量を調節した部分フッ素化リン脂質を用いて膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) の再構成を行い、その構造や機能を解析すること、またフッ素化されていない再構成した系との比較からフッ素化の影響を調べ、フッ素化リン脂質が膜タンパク質の再構成基材として有用であるかを評価することを目的とする。

1.8 参考文献

1. E. Wallin, G. von Heijne, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1029–1038.
2. D. T. Jones, *FEBS Lett.* **1998**, *423*, 281–285.
3. S. Mitaku, M. Ono, T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, M. Sonoyama, *Biophys. Chem.* **1999**, *82*, 165–171.
4. R. Sawada, R. Ke, T. Tsuji, M. Sonoyama, S. Mitaku, *Biophysics* **2007**, *3*, 37–45.
5. M. le Maire, P. Champeil, J. V. Moller, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 86–111.
6. J. L. Popot, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 737–775.
7. F. H. Shepherd, A. Holzenburg, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 21–27.
8. C. der Mardirossian, F. Lederer, *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 32S.
9. C. der Mardirossian, M. P. Krafft, T. Gulik-Krzywicki, M. le Maire, F. Lederer, *Biochimie.* **1998**, *80*, 531–541.
10. E. Chabaud, P. Barthelemy, N. Mora, J. L. Popot, B. Pucci, *Biochimie.* **1998**, *80*, 515–530.
11. P. Barthélémy, B. Ameduri, E. Chabaud, J. L. Popot, B. Pucci, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1689–1692.
12. C. Breyton, E. Chabaud, Y. Chaudier, B. Pucci, J. L. Popot, *FEBS Lett.* **2004**, *564*, 312–318.

13. M. V. Rodnin, Y. O. Posokhov, C. Contino-PÈpin, J. Brettmann, A. Kyrychenko, S. S. Palchevskyy, B. Pucci, A.S. Ladokhin, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4348 – 4357.
14. C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *30*, 567 – 568.
15. F. Frezard, C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1192*, 61 – 70.
16. F. Frezard, C. Santaella, M. J. Montisci, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1194*, 61 – 68.
17. C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, T. Gulik-Krzywicki, A. Gulik, B. Monasse, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1190*, 25 – 39.
18. C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 173 – 177.
19. J. P. Rolland, C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79*, 71 – 77.
20. T. J. McIntosh, S. A. Simon, P. Vierling, C. Santaella, V. Ravily, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1853 – 1868.
21. C. Gege, M. F. Schneider, G. Schumacher, L. Limozin, U. Rothe, G. Bendas, M. Tanaka, R. R. Schmidt, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 216 – 224.
22. N. C. Yoder, V. Kalsani, S. Schuy, R. Vogel, A. Janshoff, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9037 – 9043.
23. S. Schuy, S. Faiss, N. C. Yoder, V. Kalsani, K. Kumar, A. Janshoff, R. Vogel, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8250 – 8256.

24. R.B. Gennis 著 西島正弘他共訳、生体膜 分子構造と機能、シュプリンガー・フェアラーク東京、1990
25. D. Voet, J. G. Voet, Voet Biochemistry 3e, John Wiley & Sons, Inc. 2004
26. S. J. Singer and G. L. Nicolson. *Science*. 1972, 175(4023). 720-731.
27. 日本生化学会、生化学実験講座3 脂質の化学、東京化学同人、1974
28. 佐藤清隆・小林雅通、脂質の構造とダイナミックス、共立出版、1992
29. 末崎幸生、脂質膜の物理、九州大学出版会 2007
30. L. Finegold, M. A. Singer. *Chem. Phys. Lipids*. 1984, 35. 291-297.
31. H. H. Chang, R. K. Bhagat, R. Tran, P. Dea. *J. Phys. Chem. B*. 2006, 110. 22192-22196.
32. A. Blume. *Biochemistry*. 1983, 22. 5436-5442.
33. 高木俊之・高井克毅・馬場照彦・金森敏幸、バイオ材料としての部分含フッ素脂質液晶膜の設計と特性化、有機合成化学協会誌 vol.68、206-215、2010
34. M. P. Krafft. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, 47 209-228.
35. S. Schuy, S. Faiss, N. C. Yoder, V. Kalsani, K. Kumar, A. Janshoff, and R. Vogel. *J. Phys. Chem. B*. 2008, 112. 8250-8256.
36. J. M. Sturtevant, C. Ho, and A. Reimann. *Biochemistry*. 1979, 76, 2239-2243.
37. D. Oesterhelt, W. Stoeckenius. *Methods Enzymol*. 1974, 31,667-678.
38. D. Oesterhelt, L. Schuhmann, H. Gruber. *FEBS Lett*. 1974, 44(3), 257-261.
39. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, and S. Mitaku. *Proteins*. 2004, 54, 442-454.

40. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, and S. Mitaku. *J. Biochem.* **2002**, *131*. 785-790.
41. M. Sonoyama, S. Mitaku. *J. Phys. Chem. B.* **2004**, *108*, 19496-19500.
42. M. P. Krebs, T. A. Isenbarger. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1460*. 15-26.
43. J. K. Lanyi, B. Schobert. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*. 439-450.
44. R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*. 899-929.

第2章 リン脂質ジミリストイルホスファチジルコリンのミリストイル基への部分フッ素化による熱及び界面物性への影響

2.1 背景

フッ素化した界面活性剤や脂質などの両親媒性分子は特徴的な性質を持つため、生物工学および生物医学的応用の観点から注目を集めている。¹ もともとフッ素化された脂質は、Riess や Vierling および共同研究者たちによって、薬物送達システムに適用可能な非常に安定したリポソームの材料として開発された。フッ素化された脂質に関する物理化学的な先行研究としては、部分的にフッ素化した脂質膜におけるフッ素化セグメントの効果として膜の剛直化や高い熱安定性、高い膜透過性を持ち、また通常のアシル鎖を持つ二重膜よりも深い傾斜で傾くなど、物理的、構造的に非常に特徴的な性質を持つことが示されている。²⁻¹¹ しかしながら、フッ素化脂質が膜タンパク質を組み込むための材料として利用するための研究の報告はなされていない。

含フッ素界面活性剤のバイオ分野における有用性は高いが、一方で実用上の問題もある。まず、含フッ素界面活性剤の疎水鎖であるパーフルオロアルキル鎖は、炭化水素との相互作用が乏しいため、フッ素原子導入量によっては、その溶剤が限定されることが多い。また、パーフルオロアルキル鎖は内部回転障害が大きいいため、結晶質になりやすい。このため、膜タンパク質研究への応用を考えた場合、フッ素原子導入量が高い疎水鎖では、室温から生理

的溫度の範囲で、凝縮膜あるいは固体膜状態となり、タンパク質機能の発現に必要な膜流動性に乏しく、膜タンパク質の再構成基材としては適切ではない。さらに、高度にフッ素化された疎水鎖の場合、生体分子との分子間相互作用が乏しく、天然由来の脂質やタンパク質との相溶性が低下して、混合・再構成操作ができない懸念もある。その他、フッ素原子導入にかかる総コストが高いこと、フロン問題と同じく分解物が環境負荷となる側面があることから、可能な限り F 原子導入量を抑える必要もある。そのような意味で、完全にフッ素化された疎水鎖よりも、部分的に F 原子を導入した疎水鎖が望ましい。¹³⁻¹⁶

膜タンパク質研究のための有望な材料として、産業技術総合研究所の高木博士らは近年、部分的にフッ素化されたリン脂質の非常に有用な合成方法を開発した。¹⁷ これまでの研究より、C-C 三重結合と異なる長さのパーフルオロアルキルグループを有する二本鎖ホスファチジルコリン (PC) の気水界面における拡散平衡圧力 (Π_e) の測定により、末端疎水セグメントの少なくとも 4 つ以上の水素原子をフッ素原子に置換した場合、単分子膜の安定化効果が実証された。¹⁸

本章では、長さの異なるパーフルオロアルキル基を有する、部分的なフッ素化飽和 PC の一連の物理化学的研究の第一段階目として、1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) のミリストイル基のブチルセグメントをパーフルオロ基に置き換えた 1,2-di(11,11,12,12,13,13,14,14,14-nonafluorotetradecanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (F4-DMPC) を新たに合成し、示差走査熱量測定 (DSC)、広角 X 線回折 (WAXD)、面圧面積 (Π -A) 測定、 Π_e 測定、2-dimethylamino-6-lauroyl naphthalene

(LAURDAN)を用いた蛍光測定など、種々の物性評価をおこなった。

2.2 試料と実験方法

2.2.1 試料の調製

部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC (図 2.2.1) は産業総合技術研究所の高木らにより、提供していただいた試料を用いた。リン脂質 DMPC (図 2.2.2) と蛍光色素 LAURDAN (図 2.2.3) は、それぞれ市販品の Avanti Polar Lipids 社、および Molecular Probes 社から購入したものを使用した。¹⁷⁻²²

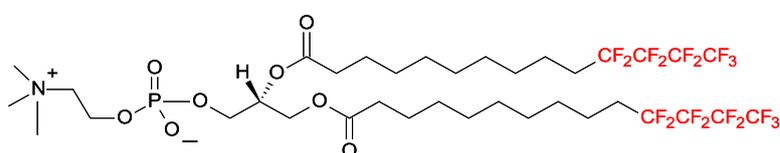


図 2.2.1 F4-DMPC

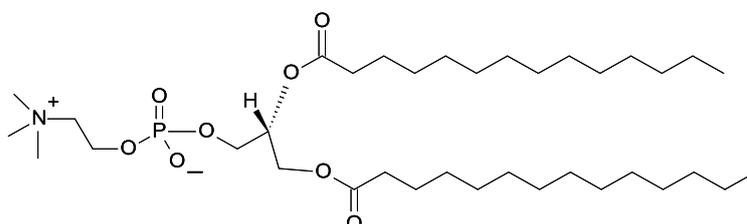


図 2.2.2 DMPC

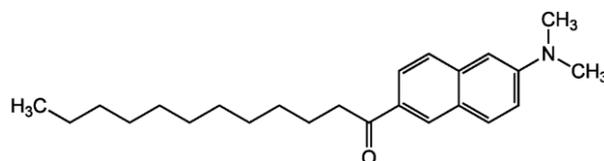


図 2.2.3 蛍光色素 LAURDAN

ストック溶液を調製するため、脂質および蛍光プローブをクロロホルムに溶解し、脂質ス

ストック溶液を、また脂質とプローブのモル比が 500 : 1 の脂質プローブ混合ストック溶液を調製した。ストック溶液を乾燥窒素気流下において、溶媒を蒸発させることによってフィルム状の脂質膜を準備した。DSC 測定において使用される試料は、100 mM の濃度で MilliQ 水に脂質膜を懸濁し、バス型ソニケーターを用いて 30 °C で 1 時間超音波処理することによって調製した。LAURDAN 蛍光測定のために、脂質および LAURDAN の混合フィルムは、約 10 分間約 45 °C の MilliQ 水で水和した後、約 0.5 mM の最終脂質濃度でのインキュベーション後にボルテックスを用いて調製した。

2.2.2 測定方法

脂質二重層の温度遷移は DSC-6100 示差走査熱量計 (SEIKO 社製) によって観測した。この時の昇温速度は 1 °Cmin⁻¹ でおこなった。X 線回折測定は、フォトンファクトリーのビームライン 15 A でおこなった。²³ X 線ビームの波長は 0.15 nm であり、サンプルと検出器間の距離は、約 167 mm であった。X 線回折パターンは、富士イメージングプレートを使用して記録した。データのデジタル化は、BAS2000 システム (富士写真フイルム株式会社製) を用いておこなった。露光時間は 180 秒でおこなった。IP の二次元データを、FIT2D ソフトウェアを使用して一次元データへ変換した。²⁴ 散乱角は、ベヘン酸銀の回折パターンを用いて校正した。²⁵ サンプルは光学顕微鏡 (メトラートレド社 FP 84) のための DSC 装置で測定し、同時に温度制御もおこなった。²⁶ *IT*-A 等温線は、二つの親水

性の障壁と 30.0 ± 0.2 °C のサンドブラスト処理の白金板に電子天秤を搭載した KSV minitrough (KSV インストルメンツ社) で測定した。純水 (>18 M³cm、pH は約 6) の表面上に脂質溶液からの脂質単分子膜を拡散した後、少なくとも 10 分間それを残して、対称的な圧縮が $0.180.28$ NM²molecule⁻¹min⁻¹ の一定のバリア速度を適用することにより測定をおこなった。また *II-e* 測定は、次のようにおこなった。¹⁸ 脂質二重膜の疎水性/親水性界面領域の周囲の極性は、極性感受性蛍光 LAURDAN によりプローブした。定常状態の蛍光発光スペクトルは、5 nm の帯域幅を有するキセノンアークランプを備えた RF-5300 蛍光分光光度計 (島津製作所) を用いて 380~650 nm の領域で測定した。励起波長は 361 nm であった。温度は RCS-20D (Lauda 社) を用いて約 0.5 °C の精度で制御した。蛍光スペクトルシフトを Parasassi らによって提案された一般化された偏光関数 (GP) を計算することにより定量的に評価した。²⁰⁻²²

2.3 結果と考察

F4-DMPC および DMPC リポソームの DSC 曲線を図 2.3.1 に示す。

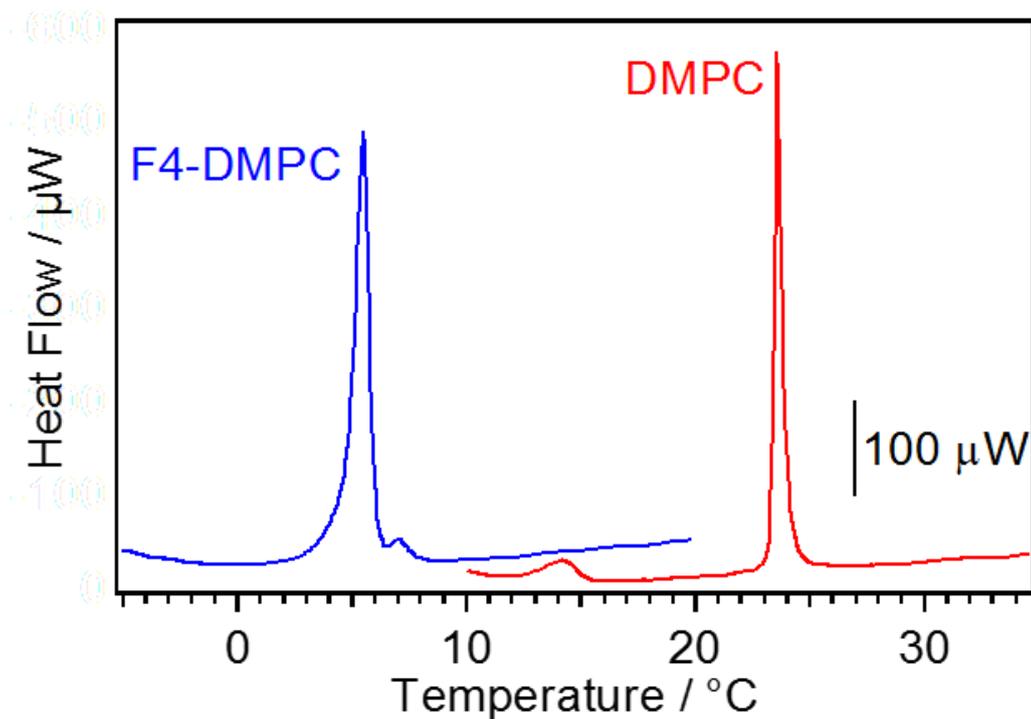


図 2.3.1 DSC 曲線 (青 : F4-DMPC、赤 : DMPC)

DMPC のゲル液晶相転移における転移温度 T_m は 23.6 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 、転移エンタルピー ΔH は 18.9 ± 1.4 kJ mol^{-1} であった。これは先行研究の結果とよく一致した。^{27,28} 一方で、DMPC を部分的にフッ素化した F4-DMPC は 7 $^{\circ}\text{C}$ 付近にわずかなショルダーを持つ 5.4 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ に主転移の鋭い吸熱ピークが観測された。測定の際、リポソームの測定は 0 $^{\circ}\text{C}$ 以下の温度から測定を開始する必要がある、リファレンスである MilliQ 水の凍結を回避するため、リファレンスとして空気のみが含まれた空のセルを用いて測定をおこなった。多くの

場合、試料を 0 °C以下に冷却した場合でも氷の融解ピークは観察されなかった。これは試料中のリポソームの存在が水の過冷却を高めるためであると考えられる。しかしながら、まれに氷融解ピークが 0 °Cで観察されたため、このような場合の結果は放棄した。

また疎水鎖の充填構造を調べるために、F4-DMPC リポソームの温度依存広角 X 線回折測定をおこなった。代表的な 1 °C及び 10 °Cの回折パターンを図 2.3.2 に示す。

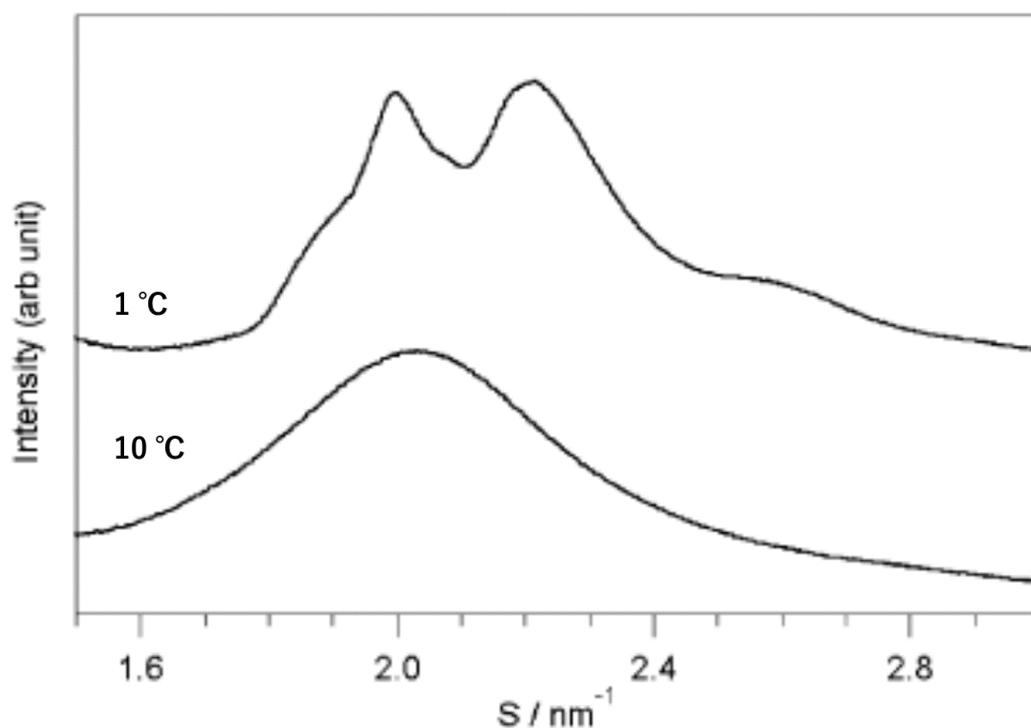


図 2.3.2 F4-DMPC の X 線回折パターン (1, 10 °C)

5 °C以下では 2.00 nm⁻¹と 2.22 nm⁻¹に 2 つに分かれたブロードなピークが現れたが、5 °C付近において 2.04 nm⁻¹を中心とした単一のブロードなピークへ変化した。これらの測

定結果は F4-DMPC リポソームの 5.4 °C の主吸熱ピークがゲル-液晶相転移である熱転移によるものであることが示唆している。F4-DMPC リポソームの転移温度 T_m は DMPC リポソームのものに比べ著しく低く、また転移エンタルピー ΔH は $30.0 \pm 0.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、これは DMPC リポソームよりおよそ 10 kJ mol^{-1} 近く高いものであった。この部分的なフッ素化による転移温度の著しい減少は、部分的にフッ素化されたジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) の場合でも同様に起きることが報告されており、詳細は後述する。また 7 °C 付近に僅かに現れるショルダーは、-2 °C から 14 °C の加熱冷却のプロセスを繰り返しても消失せず、フルオロカーボンと炭化水素セグメントとの間の総拳動の違いに起因する可能性が考えられるが、その原因は現時点では明らかとなっていない。これは異なる長さのパーフルオロアルキル基を含む飽和二重鎖の PC シリーズのさらなる研究により、小さなショルダーと熱物性の起源を解明するのに役立つ場合がある。

F4-DMPC、DMPC 単分子膜の界面物性を 30 °C の表面圧-面積曲線 (Π - A 曲線) と Π_c 値を用いて調べた。両脂質それぞれの Π - A 曲線を図 2.3.3 に示す。

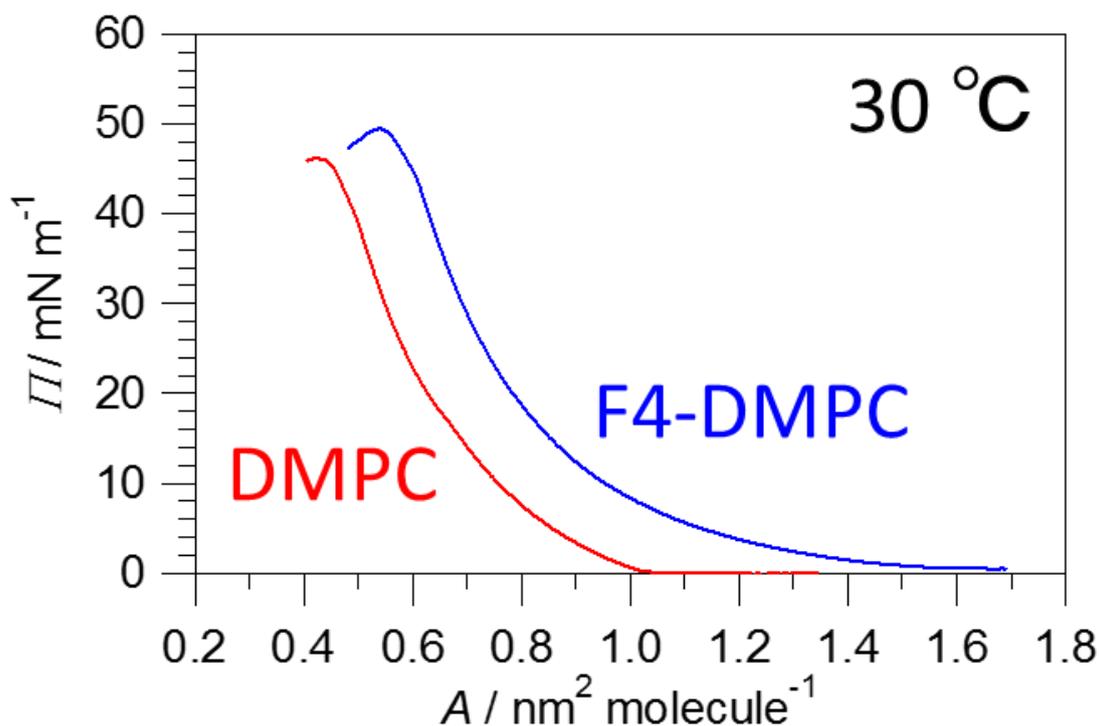


図 2.3.3 30 °Cにおける F4-DMPC (青) と DMPC (赤) の表面圧-面積曲線

30 °Cの条件下において、どちらも液体膨張膜を示した。DMPC 単分子膜の限界面積 A_{limit} は $0.715 \pm 0.007 \text{ nm}^2 / \text{molecule}$ 、崩壊圧力 Π_c は $45.6 \pm 0.5 \text{ mN m}^{-1}$ であり、これは過去の報告とよく一致した。²⁹⁻³¹ ミリストイル基が部分的にフッ素化された F4-DMPC の場合、 A_{limit} は $0.857 \pm 0.007 \text{ nm}^2 / \text{molecule}$ 、 Π_c は $49.3 \pm 0.3 \text{ mN m}^{-1}$ と値は著しく増加した。また 30 °Cにおける Π_c の値が (F4-DMPC は $51.5 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$ 、DMPC は $47.5 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$)、各 PC の Π_c のものに非常に近かった。F4-DMPC と DMPC 間の Π_c の差は F4-DMPC 単分子膜が 30 °Cでの DMPC よりも物理的に安定であることを示す。F4-DMPC のより高い安定性は Santaella と Vierling によって報告されているように、アシル鎖尾部のフッ素化による剛直効果に起因していると考えるのがもっともらしい。³² 図 2.3.3 に示す

ように A_{limit} だけでなく、約 30 mN m^{-1} の表面圧時の分子面積も DMPC に比べ F4-DMPC は大きく、これはミリストイル基の末端ブチルにおけるフッ素置換による脂質二重膜中の PC 分子の占有面積の増大が示唆された。³³ これは主に F4-DMPC の分子面積の増加はミリストイル基の末端ペルフルオロアルキル部分が寄与することが妥当である。また、C-F 結合と C-H 結合の間の結合の長さの違いに起因している。フッ素化による安定化効果は、炭化水素鎖セグメント中の分子の小さい密充填によって相殺することができ、これはおそらく F4-DMPC リポソームの T_m の大幅な減少をもたらしていると考えられる。

脂質二重膜の疎水性/親水性界面領域の周囲の極性は、極性感受性蛍光 LAURDAN により調べた。F4-DMPC 及び DMPC の蛍光スペクトルの結果 (図 2.3.4) とその変化から得られた GP 値をプロットしたものを図 2.3.5 に示す。

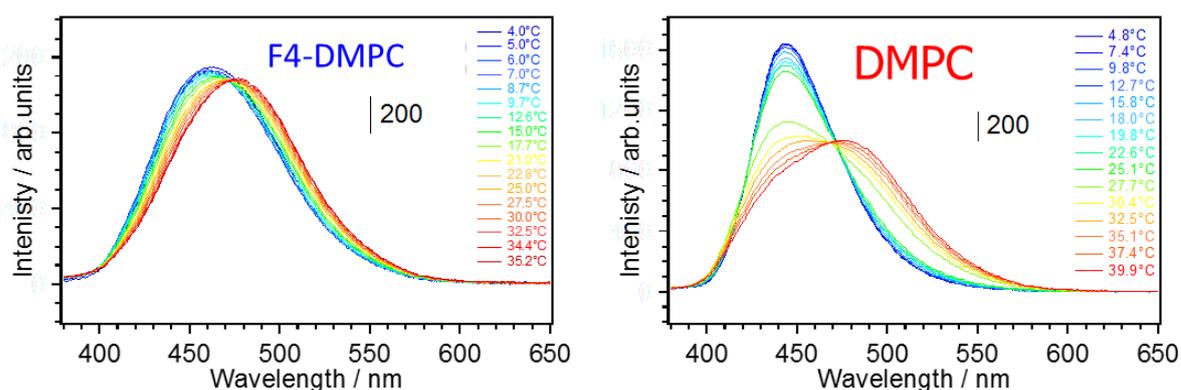


図 2.3.4 F4-DMPC リポソーム及び DMPC リポソームの蛍光スペクトル

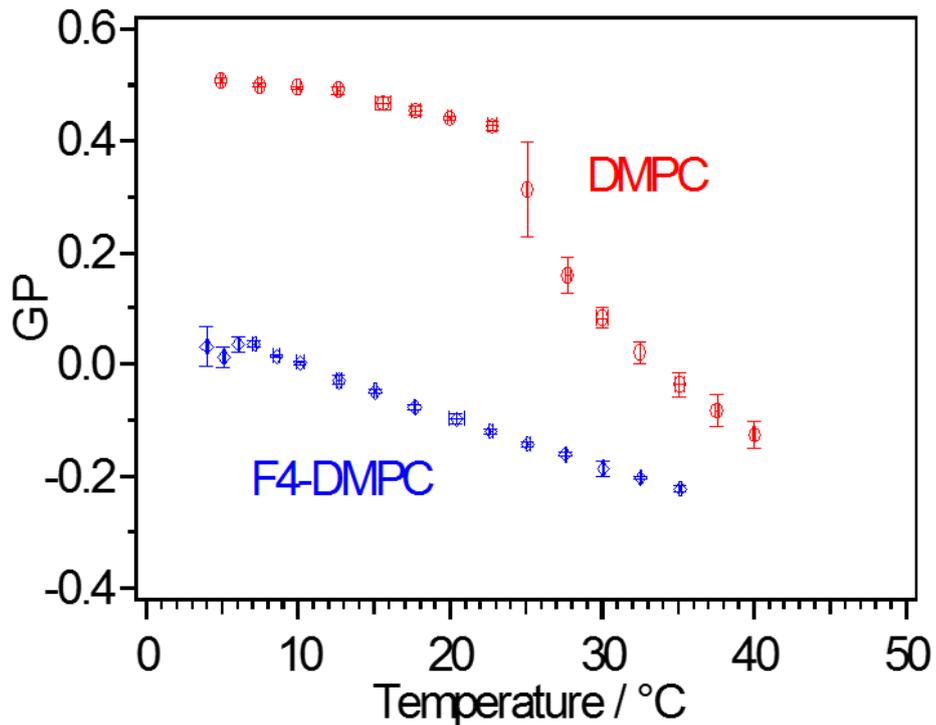


図 2.3.5 F4-DMPC リポソーム (青) と DMPC リポソーム (赤) の
 温度変化に対する Generalized polarization (GP) 値
 (440 nm と 490 nm の LAURDAN 蛍光強度より算出)

DMPC の GP 値はゲル相において約 0.5 でほぼ一定であり、相転移の温度範囲で減少し、35 °Cでは約 0 で緩やかに減少を続ける。一方で液晶相における F4-DMPC の GP 値は、8 °Cから 35 °Cの温度上昇で約 0 から-0.2 まで徐々に減少した。液晶相において F4-DMPC は DMPC よりも著しく小さい GP 値を示し、これは F4-DMPC の親水性/疎水性界面領域は DMPC よりも親水的環境であることが示唆された。表面厚測定によって、親水性/疎水性界面での興味深い特徴も、C-F 結合と C-H 結合との間の結合の長さの違いに炭化水素鎖セグメント中の分子の少ない密充填に起因する可能性が示唆された。

2.4 総論

本章では膜タンパク質研究のための有望な材料としてフッ素化リン脂質に着目し、新規部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC の熱的物性や界面物性といった物理学的性質を DSC 測定や蛍光測定により解析した。フッ素化リン脂質 F4-DMPC は非フッ素化リン脂質 DMPC と比較すると、より高い安定性を示し、疎水性/親水性界面領域におけるより高い極性を持つこと、低い相転移温度を持つことや、大きな占有面積を持つといった、いくつかの特徴的な熱物性及び界面特性を示した。

第 3 章では特徴的な膜物性を持つフッ素化リン脂質 F4-DMPC が、膜タンパク質の再構成基材としての有用性に関して検討、議論する。

2.5 参考文献

1. J. L. Popot, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 737,
2. C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *30*, 567–568.
3. F. Frezard, C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1192*, 61–70.
4. F. Frezard, C. Santaella, M. J. Montisci, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1194*, 61–68.
5. C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, T. Gulik-Krzywicki, A. Gulik, B. Monasse, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1190*, 25–39.
6. C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 173–177.
7. J. P. Rolland, C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79*, 71–77.
8. T. J. McIntosh, S. A. Simon, P. Vierling, C. Santaella, V. Ravily, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1853–1868.
9. C. Gege, M. F. Schneider, G. Schumacher, L. Limozin, U. Rothe, G. Bendas, M. Tanaka, R. R. Schmidt, *Chem. Phys. Chem.* **2004**, *5*, 216–224.

10. N. C. Yoder, V. Kalsani, S. Schuy, R. Vogel, A. Janshoff, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9037–9043.
11. S. Schuy, S. Faiss, N. C. Yoder, V. Kalsani, K. Kumar, A. Janshoff, R. Vogel, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8250–8256.
12. M. P. Krafft, M. Goldmann, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 243
13. O. Shabata, S. K. Yamamoto, S. Lee, G. Sugihara, *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184*, 201
14. R. Oda, I. Huc, D. Danino, Y. Talmon, *Langmuir* **2000**, *16*, 9759
15. T. Hiranita, S. Nakamura, M. Kawachi, H. M. Courier, T. F. Vandamme, M. P. Krafft, O. Shibata, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *265*, 83
16. H. J. Lehmler, P. M. Bummer, *Colloid Surf. B* **2005**, *44*, 74
17. K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 1959.
18. K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 686.
19. T. Takagi, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2011**, *132*, 427.
20. T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo, E. Gratton, *Biophys. J.* **1990**, *57*, 1179.
21. T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch, E. Gratton, *Biophys. J.* **1991**, *60*, 179.

22. T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 365.
23. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushita, H. Hashizume, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* **1983**, *208*, 471.
24. A. P. Hammersley, S. O. Svensson, M. Hanfland, A. N. Fitch, D. Hausermann, *High Press. Res.* **1996**, *14*, 235.
25. T. C. Huang, H. Toraya, T. N. Blanton, Y. Wu, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 180.
26. H. Takahashi, S. Matuoka, Y. Amemiya, I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76*, 115.
27. R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1998**, *1376*, 91.
28. M. Ionov, D. Wróbel, K. Gardikis, S. Hatziantoniou, C. Demetzos, J. P. Majoral, B. Klajnert, M. Bryszewska, *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 408.
29. F. Gaboriaud, R. Volinsky, A. Berman, R. Jelinek, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287*, 191.
30. M. Li, U. Retter, J. Lipkowski, *Langmuir* **2005**, *21*, 4356.
31. M. Weis, M. Vanco, P. Vitovic, T. Hianik, J. Cirák, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26272.
32. C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 173.
33. A. Meister, A. Kerth, A. Blume, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 8371

第3章 部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC と非フッ素化リン脂質 DMPC の親和性の評価

3.1 序論

第2章では、フッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への将来的な発展を期待し、疎水基の末端部分が部分的にフッ素化された F4-DMPC の単分子膜および二分子膜の物理学的性質を解析した。その結果、新規部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC は、非フッ素化リン脂質 DMPC と比較すると、より高い安定性および疎水性/親水性界面領域におけるより高い極性を示し、また低い相転移温度や、膜中における大きな分子占有面積を持つといった、いくつかの特徴的な熱物性及び界面特性を示すことがわかってきた。

生体膜中において、膜タンパク質は脂質二重膜に取り込まれて機能している。脂質二重膜の物理的状态は膜タンパク質の機能に影響し、生体膜の機能を調節する役割を持つと考えられている。^{1,2} 膜タンパク質の機能・構造の解析を行うための試料の調製法として、天然膜に存在する目的の膜タンパク質のみを抽出し、新たに人口脂質二重膜へ埋め込む“再構成法”という手法がある。膜タンパク質を天然膜から取り出し、別の脂質二重膜へ再構成した場合、天然膜中の膜タンパク質と再構成膜中の膜タンパク質の機能や状態が変化することが予想される。これは生体膜の脂質二重膜は様々な異なる脂質分子、すなわち多成分系で構成されているためである。そのため、人口脂質二重膜中に再構成された試料においても、天然膜中の膜タンパク質のような振る舞いを再現させる必要がある。

実際の生体膜を模倣するために、フッ素化された分子と膜脂質の混合物が、生物物理学的

研究における内在性膜タンパク質のためのマトリックスとして期待される。フッ素化された分子と膜脂質との間の詳細な相互作用は、このような研究によって得られた結果の適切な解釈のために明確にする必要があると考えられる。これはフッ素化界面活性剤を用いた膜タンパク質抽出または結晶化の機構の、より深い理解のために必要であり、異なる分子間の分子間相互作用が混和性に関連している。フッ素化両親媒性分子は多くの場合、非フッ素化のものから分離する傾向がある。^{3,4} 同様の傾向は、いくつかのフッ素化および非フッ素化リン脂質二重膜の混合物について報告されており、これらの二重層系における混和性の程度を定性的にのみ研究が報告されているが、フッ素化および非フッ素化リン脂質二重層混合物の混和性の程度は、熱力学モデルや理論に基づいて定量的に特徴付けされていない。⁵⁻⁹

本章では、水和二層システムで F4-DMPC と DMPC との間の相溶性の定量的評価を試みた。正則溶液理論は広くフッ素化界面活性剤ミセル混合物と通常のリン脂質二重層の混合物の両方で動作する混合の解析のために使用されてきた。¹⁰⁻¹² 正則溶液理論は、いくつかの単純な仮定に基づいておこなった。この単純な理論を用いて、示差走査熱量測定 (DSC) 測定によって得られた転移温度データを解析した。ここでは、F4-DMPC/DMPC 混合物の相図は共晶のものであることと、正則溶液理論がよく測定されたデータに合わせて境界曲線を与えることができると報告しており、混合物の非理想的な混合動作は炭化水素とフルオロカーボンの相分離によって説明することができるかどうかを議論する。

3.2 試料と実験方法

3.2.1 試料の調製

試料の調整方法は基本的に第 2 章のものに基づいておこなった。F4-DMPC は産業技術総合研究所の高木博士らに提供していただいた試料を用いた。DMPC は市販品の Avanti Polar Lipids 社から購入したものを精製することなくそのまま使用した。

DMPC および F4-DMPC をクロロホルムに溶解し、それぞれのストック溶液を準備した。混合物は所望のモル分率となるように、それぞれのストック溶液をバイヤルにおいて所定の割合で混合し、溶媒を窒素気流下で乾燥、蒸発させた。残留溶媒を完全に除去するために、バイヤル内の壁面にフィルム状になるまで試料を真空中で 16 時間乾燥した。乾燥後、得られたフィルム状の脂質試料を MilliQ 水で懸濁し、両脂質の転移温度以上である 30 °C で 1 時間、バス型ソニケーターで超音波処理することによって脂質懸濁液（リポソーム）を調製した。脂質濃度は、それぞれ X 線回折及び熱量の測定のために、～30 wt% 及び 100 mM (7~10 wt%) で調製した。

3.2.2 測定方法

脂質二重層の温度遷移は SEIKO 社製 DSC-6100 示差走査熱量計によって測定した。この時の昇温速度は $1\text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ でおこなった。インジウムの融解転移は、機器の校正に用いた。

X 線回折測定は、高エネルギー加速器研究機構（つくば、日本）のビームライン 15A の 0.15 nm の波長を有するシンクロトロン X 線ビームを用いた。¹³ カメラ長 (167 mm) はベヘン酸銀の回折パターンを用いて校正した。¹⁴ 回折パターンは、富士イメージングプレート (IP アドレス) に記録し、データを 50 の LM 画素サイズの IP リーダー (BAS-2500、富士フィルム) で読み取り、IP の二次元回折像データは FIT2D ソフトウェアを使用して一次元プロファイルに変換した。¹⁵ 相互間隔は $S = 1/d = (2/k) \sin \theta$ で表され、この時の d は格子間隔、 2θ は散乱角であり、回折プロファイルを表示するために使用した。試料は、温度コントローラとして使用される光学顕微鏡 (FP 84、メトラー・トレド) の DSC 装置に装着した。また再現性を確認するために、別のビームライン 9C での測定もおこなった。¹⁶

3.3 結果と考察

DMPC および F4-DMPC、またその混合物の典型的な DSC 曲線を図 3.3.1 に示す。この時の混合膜中の F4-DMPC 含有率は 100.0、87.5、75.0、62.5、50.0、37.5、25.0、12.5、0.0 Mol% である。混合比率を変えても F4-DMPC と DMPC のそれぞれのピークが独立して現れた。

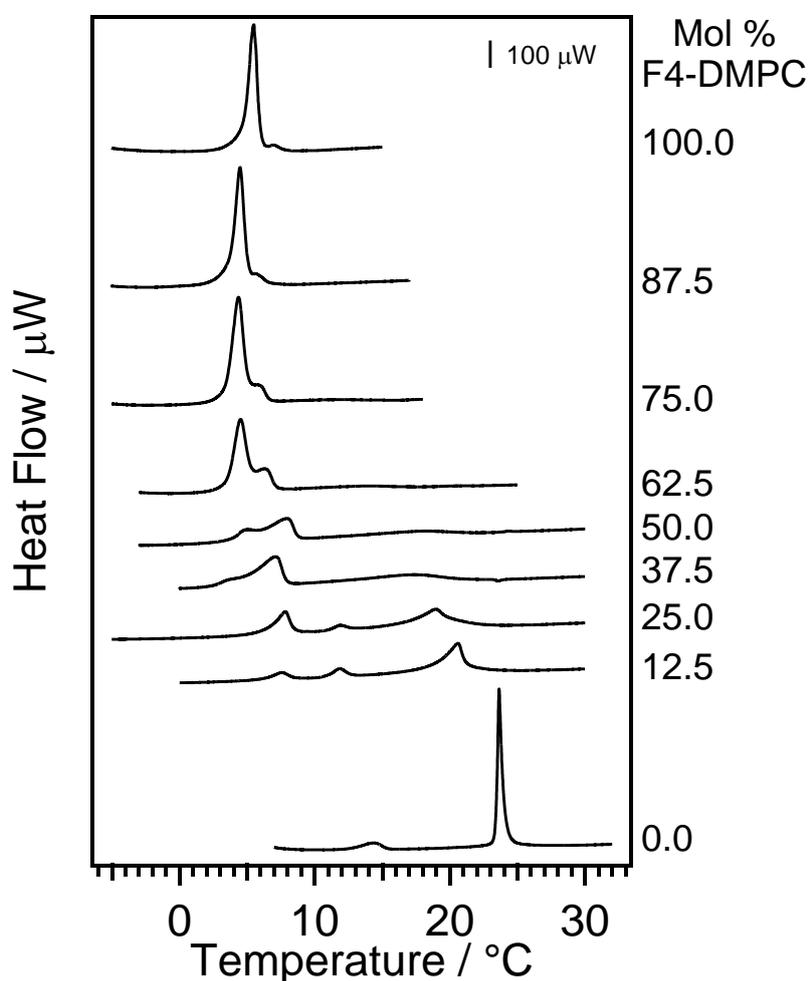


図 3.3.1 DMPC/F4-DMPC 混合物の DSC 曲線 (F4-DMPC のモル分率)

純粋な DMPC の DSC 曲線中には 2 つの相転移ピークが現れた。14.5±0.1 °C ($\Delta H = \sim 3 \text{ kJ mol}^{-1}$) の低温側のピークはゲル相からリップル相への転移、23.6±0.1 °C ($\Delta H = 18.9 \pm 1.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) の高温側のピークはリップル相から液晶相への転移をそれぞれ示している。

¹¹ DMPC のこれらの観察された転移データは、文献で報告されたものと比較してもよく一致している。¹⁷ また F4-DMPC 二重膜の転移温度は 5.4±0.1 °C、転移エンタルピーは 30.0 ±0.5 kJ mol⁻¹であった。DMPC と比較すると、相転移温度は約 18 °C 低下したことを示し、アシル鎖の部分的なフッ素化は、他の文献と同様に相転移温度の低下をもたらすことがわかった。^{6,7} これらは第 2 章の結果の通りである。

また図 3.3.1 は、DMPC と F4-DMPC の混合挙動がはるかに理想的混合から外れていることを示している。純粋な F4-DMPC の転移温度近傍に転移ピークが 12.5 Mol % の F4-DMPC の混合物においても明確に観察され、混合比率を変えた場合にそれぞれの脂質の転移ピークが独立している。

図 3.3.2 に得られた熱量測定データによって構成された温度-組成相図を示す。

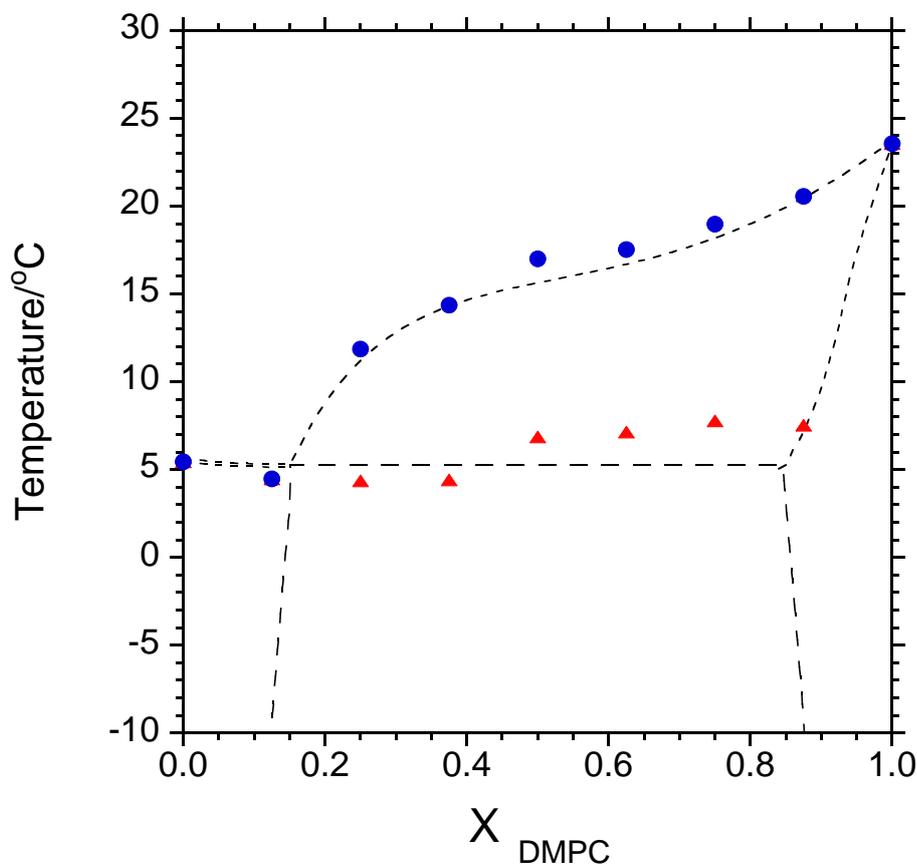


図 3.3.2 DMPC/F4-DMPC 混合物の相図

この時の DMPC のモル分率の横軸は、以下によって定義した。

$$X_{DMPC} = \frac{[DMPC]}{[DMPC]+[F4-DMPC]} \quad (3.1)$$

X_{DMPC} と温度の誤差はそれぞれ 0.01 以下と 0.1~0.3 °C と見積もられた。エラーバーに関しては図を明確にするため図示していない。さらに、より簡略化するためにリップル相を省略し、この時のゲル相はゲル相とリップル相を含むものとして仮定した。^{10,11}

二成分系の正則溶液理論は、金属合金におけるブラッグ・ウィリアムズ理論、ポリマーに

おけるフローリー-ハギンズ理論、および溶液の溶解におけるヒルデブランド理論と本質的に同一である。^{10,11} 正則溶液理論はすべての分子が無作為に混ざりあい、最も隣接する分子 A と B の間に、相互作用があることを前提としている。最隣接相互作用は過剰混合エンタルピー (ΔH_{mix}) などに寄与することが仮定される。

$$\Delta H_{mix} = \rho X_A X_B = \rho X_A (1 - X_A) \quad (3.2)$$

ここで X は分子のモル分率を表し、 ρ はエネルギーの単位を有する非理想性パラメータである。 $\rho > 0$ の時、A と B は非混合の傾向がある。混合エンタルピー変化 ΔS_{mix} は理想的溶液理論と同様の方法で計算されているものとする。これらの仮定から、ゲル相 ; G と液晶相 ; L 状態における A 成分と B 成分の化学ポテンシャル (μ_A と μ_B) の方程式が得られる。

熱力学的平衡の条件から、

$$\mu_A^G = \mu_A^L, \quad \mu_B^G = \mu_B^L$$

固体領域と共存領域の間の境界線 (固体相曲線) と流体領域と共存領域の間の境界線 (液体相曲線) によって決定する熱力学方程式が求められる。

$$RT \ln(X_A^L/X_A^G) + \rho^L (1 - X_A^L)^2 - \rho^G (1 - X_A^G)^2 = -\Delta H_A (1 - T/T_A) \quad (3.3)$$

$$RT \ln[(1 - X_A^L)/(1 - X_A^G)] + \rho^L (X_A^L)^2 - \rho^L (X_A^L)^2 = -\Delta H_B (1 - T/T_B) \quad (3.4)$$

ρ^G と ρ^L がそれぞれゲル相と液晶相の非理想のパラメータ ρ の値である。T は温度、R は気体定数、 ΔH_A 、 ΔH_B 及び T_A 、 T_B は A および B のそれぞれ純粋な転移エンタルピー及び相転移温度を示す。式 (3.3) および (3.4) は超越的關係性にあり、仮に ΔH_A 、 ΔH_B 及び T_A 、 T_B の値が与えられても、 ρ^G と ρ^L の値を解析することができない。これらの値を得る

ために、式 (3.3)、(3.4) の数値の反復フィッティングで明らかにする必要がある。通常の溶液中で混合の自由エネルギー変化 (ΔG_{mix}) は次の様に示される。

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} = \rho X_A X_B + RT(X_A \ln X_A + X_B \ln X_B) \quad (3.5)$$

高い温度では、 $T\Delta S_{mix}$ はすべて組成物のための ΔH_{mix} よりも大きくなる。式 (3.5) は全ての組成で下に凸であり、単一の最小値を持つ。一方低温では、式 (3.5) は中央上に凸であり、さらに2つの最小値を持つ。相分離は、二つの最小値の間の組成物中に後者の状況で発生する傾向がある。すなわち、混和性のギャップが相図に現れる。最小値の位置を $d(\Delta G_{mix}) / dX_A = 0$ を計算することによって導出することができる。

$$RT \ln[X_A/(1 - X_A)] = \rho(2X_A - 1) \quad (3.6)$$

式 (3.6) を用いることで、混和性ギャップの曲線を描くことができる。この曲線は、固体相および液体相曲線と重なっている場合には、境界がギブス相規則に従って決定される。

相境界曲線は、温度データを当てはめることによって決定した。反復フィッティング分析を式に基づいておこなった。0.01 kJ/mol のステップは、反復計算に使用され、これは、5.69 kJ/mol と 4.17 kJ/mol の ρ^G と ρ^L 値は、それぞれ最適なフィッティングを与えたことを示した。転移エンタルピー、温度、および組成比の実験誤差から判断すると、最終的な推定値は、 $\rho^G = 5.7 \pm 0.1$ kJ/mol、 $\rho^L = 4.2 \pm 0.1$ kJ/mol となった。

式 (3.5) と ρ^G の推定値を用いて、混和性ギャップの境界曲線を描くと、このギャップの曲線が他の曲線と重なった。境界は、ギブス相規則に従って決定し、このようにして得られた相図は、共晶タイプである。

その結果、異なる組成を有する 2 つのゲル相が混和性ギャップ内に共存することが予想された。この機能を調査するために、混合物の広角 X 線回折測定をおこなった。その結果を図 3.3.3 に示す。

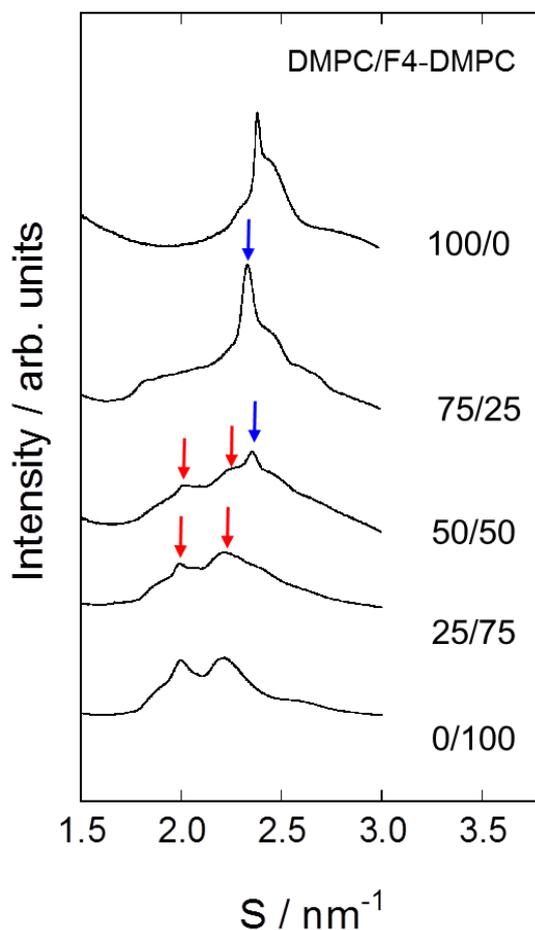


図 3.3.3 DMPC/F4-DMPC 混合物の広角 X 線解析パターン

測定は 0 °C 以下でおこなったが、水の凝固点降下が脂質の存在によって生じたことを示し、氷の回折ピークは全く観察されなかった。純粋な DMPC において、 $S = 2.38 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 0.420 \text{ nm}$) に鋭いピークと $S = 2.46 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 0.407 \text{ nm}$) を中心にブロードなショルダー ($d = 0.407 \text{ nm}$) がそれぞれ (20) に連動し、 (1 ± 1) 反射された。¹⁸ ゲル相中 DMPC の

炭化水素鎖は、斜方晶系の単位格子中に充填されている。¹⁸ 二つの鎖当たりの断面積は、 0.390 nm^2 であることが間隔値から計算された。純粋な F4-DMPC の X 線回折パターンは、 $S = 2.00 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 0.500 \text{ nm}$) と $S = 2.22 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 0.450 \text{ nm}$) を中心とした二つのブロードなピークで構成されている。これらの炭化水素に比べてより長い間隔は、フルオロカーボンの大きな体積を意味することが考えられる。純粋な DMPC の $S = 2.33 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 0.429 \text{ nm}$) のものと比較して、25 mol% の F4-DMPC を含む混合物に、鋭いピークがわずかに小さい角度側にシフトした。これは、純粋な DMPC 領域ではなく、DMPC に富む領域に由来するピークであることを意味する。また、 $1.7 \sim 2.3 \text{ nm}^{-1}$ の領域にブロードなピークが確認され、これは F4-DMPC に富む領域から反射された可能性がある。混合物の異なる領域に由来する二つの異なるスペクトルの重ね合わせで構成される 1:1 混合物の X 線回折パターンにより明らかになった。広角のピークの $S = 2.22 \text{ nm}^{-1}$ に観測された小さなショルダーは、75 mol% の F4-DMPC を含む混合物から検出することができる。X 線測定は、このように相分離を引き起こす明確な証拠を示した。

DMPC と F4-DMPC の混合物の相図は、DSC 測定を用いて得られたデータを分析することによって構築したが、得られた相図は理想的な混合のものとはかけ離れたものであった。混合動作の議論の前に、純粋な F4-DMPC 二重層の構造と熱力学的パラメータについて考える必要があるだろう。

F4-DMPC 二重層の広角 X 線回折パターンは、2 つのピークを示した。粉末 X 線回折のデータは、鎖の二次元パッキング格子を決定するには不十分である。したがって、暫定的に

2.00 と 2.22 nm⁻¹ のピークをそれぞれ DMPC に類似した斜方格子の反射 (2 0) と (1±1) に割り当てて考えた。¹⁸ この暫定的な割り当ては 0.50 nm² の F4-DMPC の二つの鎖が占める面積が、ゲル相での DMPC よりもおよそ 1.3 倍大きいことを示す。フルオロカーボンの断面積は炭化水素のよりも約 1.4 倍大きいことから、これらの値の近さは、さらに詳細な研究が必要とされるものの、もっともらしいことを示唆している。

純粋な F4-DMPC の鎖融解転移エンタルピー (30.0 kJ/mol) は、純粋な DMPC のもの (18.6 kJ/mol) よりも約 1.6 倍大きい。他の部分的にフッ素化された PC でも、対応の PC を超える転移エンタルピー値を有することが報告されている。⁶ 脂質二重層の鎖溶融転移では、鎖の全トランスコンホメーションは、トランスとゴーシュ配座の両方を含むランダムな状態に変換される。これらのトランスとゴーシュ配座の間の交換エンタルピーは、炭化水素に比べて線形フルオロカーボンのために大きくなる。しかしながら、これは、F4-DMPC の大きなエンタルピーの主な起源ではない。分子動力学 (MD) シミュレーション研究より、F4-DMPC のフッ素化された部分の立体構造があっても液晶相でほぼ全トランスであることを示しているからである。¹⁹ 部分的にフッ素化された PC に密接に関連した他の MD 研究も、同じ結論に達している。^{20,21} エントロピーの変化は、遷移温度によって転移エンタルピーの比率として計算される。現在の測色データは F4-DMPC の転移エントロピーが DMPC を超えていることを示唆している。フルオロカーボンおよび炭化水素間の体積差のため、F4-DMPC の末端フッ素化鎖部分の存在は DMPC の頭部間よりも、隣接する炭化水素の間に大きな空間を引き起こすことが考えられる。特に液晶相では、この大きな空間が頭

部および炭化水素のより大きな変動につながる。大きな変動は、このように液晶相に大きなエントロピーを引き起こす。したがって、これは DMPC と比較して F4-DMPC の大きな転移エンタルピーに貢献する可能性が示唆された。

DMPC と F4-DMPC の混合物の相図は、低温での混和性ギャップを有する。X 線回折測定より、混和性のギャップが生じることが明らかになった。正則溶液理論に基づく本分析では、それぞれ 5.7 ± 0.1 kJ/mol および 4.2 ± 0.1 kJ/mol であることが非理想パラメータ ρ^G と ρ^L の値を与えている。それは次のように炭化水素鎖の長さの差が増加すると、飽和リン脂質二成分混合物は多くの非理想的な混合動作を示す傾向があることはよく知られている。例えば、DMPC とジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) の混合物では、 ρ^G と ρ^L 値は、それぞれ 0.42 kJ/mol および 0.0 kJ/mol であることが報告されている。²² DMPC とジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) の混合物では、 ρ^G と ρ^L 値は、それぞれ 3.4 kJ/mol および 2.0 kJ/mol にと報告されており、したがってこれらの値の比較から判断すると、炭素 4 つ分のフッ素化による影響は、4 個の炭素原子の炭化水素鎖の長さの差よりも非理想的な混合動作を引き起こす。²³

非理想パラメータの同様の大きな値は、PC 混合飽和鎖を有する 1-stearoyl-2-capryl-PC と DMPC の混合物について報告されている。¹² 液体状態のフルオロカーボンと炭化水素との間の非理想性の程度は、通常、溶解パラメータを使用して表現される。パラメータ δ は $\sqrt{\Delta E^V/V_m}$ で定義され、 ΔE^V は蒸発のエネルギー、 V_m はモル体積を意味する。ヘプタン、パーフルオロヘプタンの場合、 δ の値は、それぞれ、7.4 および 6.0 cal^{1/2} cm^{3/2} である。これら

の値から、ヘプタン、パーフルオロヘプタンの混合の非理想性パラメータは約 1.5 kJ/mol であると計算することができる。この値は、DMPC と F4-DMPC の混合物の値よりも小さい。気水界面での単分子層での DPPC と部分的フッ素化アルコール（パーフルオロオクチルペンタノール）との間の相互作用エネルギーは、Joos の方程式を用いて単層とバルク相の相境界曲線の分析をすると、0.47 kJ/mol であることが推定されている。^{24,25} 想定される最密充填単層は、上記とパーフルオロヘプタンのそれよりも大きく、これは 2.8 kJ/mol の非理想性パラメータに相当する。厳密に言えば、凝集状態が互いに単層、二層、および通常の液体状態とは異なる。それにもかかわらず、相互作用エネルギー値のこれらの比較は、第一近似として、DMPC 及び F4-DMPC との間の非理想的な混合のみ炭化水素およびフルオロカーボン部分の間の相互疎相互作用に起因していない、ということを示唆している。フルオロカーボン部分の嵩高さは、炭化水素鎖の近い充填を防止することができる。DMPC と F4-DMPC の混合物の相図の形状は、1,2-di-(x-cyclohexyl) undecanoyl-PC (11cyPC) と 1,2-di-(x-cyclohexyl)tridecanoyl-PC (13cyPC) の混合物のものと非常に似ている。¹¹ 飽和した鎖の末端にシクロヘキシル基を有するこれらの PC は、好熱バチルス・アシドカルダリウスの細胞膜に見出される。11cyPC と 13cyPC の混合物については、鎖の長さは、2つの CH₂ 基によって互いに異なっており、頭部は同一である。²⁶ これにより、非混和性の嵩高い末端シクロヘキシル基に起因することを示している。同様の状況はまた、DMPC と F4-DMPC の混合物中にも生じる可能性がある。炭化水素に対するフルオロカーボンの親和性が低いだけでなく、アルキル及びパーフルオロアルキル基の間の断面積の不一致は、部分フッ素化およ

び水素化両親媒性物質との相互疎相互作用に重要な役割を果たしているだろう。

以上の結果と考察より、混合膜中における DMPC と F4-DMPC の相挙動のモデル図を図 3.3.4 に示す。この図は混合膜中に 1 : 1 の割合で存在する DMPC と F4-DMPC が非理想的な混合挙動(相分離)を示していることを表し、膜中において DMPC に富む部分、F4-DMPC に富む部分が混在する膜になっていると考えられる。

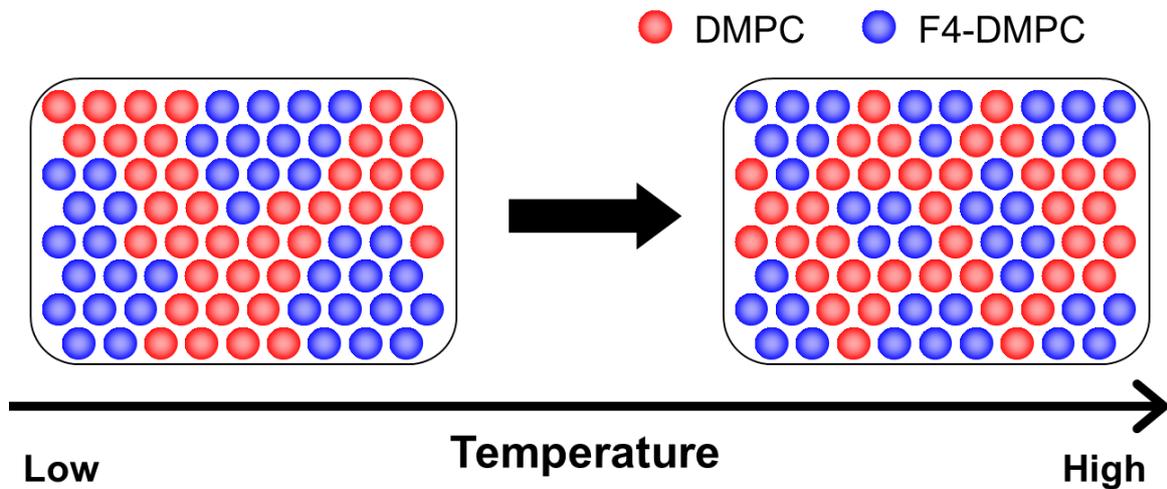


図 3.3.4 DMPC/F4-DMPC 混合膜のモデル図

3.4 総論

本章では、DMPC と F4-DMPC の混合物の相図の固相線と液相線を正則溶液理論に基づくフィッティング手順を使用して測色データから求めた。フィッティングは、非理想のパラメータの値を示し、混和性ギャップを有することを明らかにした。非理想のパラメータの値が比較的大きく、混合物は、各成分に富むドメインを形成する傾向があることを示している。他のフッ素化分子について報告されたデータと比較すること、DMPC および F4-DMPC 間の混合の非理想性の程度は、単にフルオロカーボン及び炭化水素の間の分離の傾向として解釈することができないことを推測することができた。いくつかの仮定に基づいている正則溶液理論により、近似を含有する出発アプローチとなるだろう。より洗練された理論的な処置は、部分的にフッ素化されたリン脂質と、通常のリン脂質との間の非理想的な混合挙動の詳細な分子の起源の解明のために必要とされる。DMPC と F4-DMPC が混在する混合リン脂質二重膜中における相分離が、膜タンパク質を再構成した場合、挙動にどのように影響するかが第 4 章以降の議題である。

3.5 参考文献

1. A.G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *62*, 1666.
2. A.G. Lee, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *761*, 39.
3. V. Peyre, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *305*, 14.
4. P. Long, J. Hao, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *66*, 171–172.
5. J.P. Rolland, C. Santaella, B. Monasse, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *135*, 85.
6. J.M. Sturtevant, C. Ho, A. Reimann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *2239*, 76.
7. N.C. Yoder, V. Kalsani, S. Schuy, R. Vogel, A. Janshoff, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *9037*, 129.
8. D.J. Hirsh, N. Lazaro, L.R. Wright, J.M. Boggs, T.J. McIntosh, J. Schaefer, J. Blazyk, *Biophys. J.* **1998**, *1858*, 75.
9. E.A. Smith, C.M. van Gorkum, P.K. Dea, *Biophys. Chem.* **2010**, *20*, 147.
10. A.G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *285*, 472.
11. A. Blume, *Thermochim. Acta* **1991**, *299*, 193.
12. E.E. Brumbaugh, M.L. Johnson, C.-H. Huang, *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *69*, 52.

13. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushita, H. Hashizume, *Nucl. Instrum. Methods* **1983**, 471, 208.
14. T.C. Huang, H. Toraya, T.N. Blanton, Y. Wu, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, 180,26.
15. A.P. Hammersley, S.O. Svensson, M. Hanfland, A.N. Fitch, D. Häusermann, *High Press. Res.* **1996**, 235, 14.
16. S. Abe, H. Takahashi, *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, 515, 36.
17. R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 91, 1376.
18. S. Tristram-Nagle, Y. Liu, J. Legleiter, J.F. Nagle, *Biophys. J.* 2002, 3324, 83.
19. A.M. Smondyrev, M.L. Berkowitz, *J. Chem. Phys.* **1999**, 9864, 111.
20. H. Saito, W. Shinoda, M. Mikami, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 11305, 112.
21. H. Saito, W. Shinoda, M. Mikami, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 260, 468.
22. P. Garidel, A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 83,1371.
23. I.P. Sugar, T.E. Thompson, R.L. Biltonen, *Biophys. J.* **1999**, 2099, 76.
24. S. Nakamura, H. Nakahara, M.P. Krafft, O. Shibata, *Langmuir* **2007**, 12634, 23.
25. P. Joos, R.A. Demel, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 447, 183.

26. T.A. Langworthy, *Curr. Top. Membr. Transp.* **1982**, *45*, 17.

第4章 部分フッ素化ホスファチジルコリン F4-DMPC に再構成されたバクテリオロドプシンの物理化学的解析

4.1 背景

これまでの第2章、第3章では、新規部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC は、非フッ素化リン脂質 DMPC と比較すると、より高い安定性および疎水性/親水性界面領域におけるより高い極性、5.4 °C と低い相転移温度にもかかわらず、大きな占有面積を持つこと、また正則溶液理論に基づき DSC データの結果を解析すると、F4-DMPC と DMPC の二成分で構成される混合膜中では F4-DMPC に富むドメインと DMPC に富むドメインに著しく相分離することが明らかになってきた。

本章では、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、*Halobacterium salinarum* 中に存在し7回膜貫通型ヘリックスで、光駆動プロトンポンプを有するといった、膜タンパク質の中でも最もよく特徴付けられた膜タンパク質のひとつであるバクテリオロドプシン (BR) を、F4-DMPC のリポソームへ再構成した。

F4-DMPC リポソーム中に再構成された bR の構造と機能の特性は、UV スペクトル測定、可視円偏光二色性 (CD) 測定、レーザーフラッシュフォトリススおよび X 線回折で

調査し、対応する非フッ素化リン脂質 DMPC で再構成の bR の場合との比較をおこなった。

4.2 試料と実験方法

4.2.1 試料の調製

脂質は第2章、第3章と同様に、F4-DMPCは高木らに提供されたものを、DMPCはAVANTI社製のものを精製せずにそのまま試料として使用した。¹⁻³再構成に使用した紫膜はR1M1株の高度好塩菌 *H. salinarum* から、OesterheltとStoeckeniusによって確立された方法に従って単離・精製した。⁶精製した紫膜は100 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0) で懸濁した。紫膜中のbRのタンパク質濃度は、吸光係数 $62700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて、極大吸収波長 568 nm の吸収から算出した。⁷

再構成試料の調製は、既存のホスファチジルコリン (DMPC, DPPC, DSPC) リポソームにbRを再構成する方法を元におこなった。^{4,5} まず、暗中で $10 \mu\text{M}$ の紫膜と 5 mM の Triton X-100 を混合し、25 °C で1晩インキュベートし、bRの可溶化をおこなった。混合物を 4 °C、100000 g で1時間超遠心分離をおこない、その上清を可溶化bR試料として得た。Triton X-100による可溶化は、佐々木らの報告にあるように約50°Cまで暗中所においては非常に安定であるため、今回の可溶化の試料として選択した。⁸ その後、可溶化bRとF4-DMPC懸濁液を濃度比が [bR]:[F4-DMPC]=1:150 で混合し、穏やかに攪拌した。さらに界面活性剤の除去として、Biobeads SM-2 (BIORAD) を段階的に添加し、Triton X-100を除去しながら、30°Cで1晩インキュベーションした。調製した試料をシリンジで回収し、超遠心分離をおこなったところ、透明の上清と紫色の沈殿に完全に分離することが

でき、リポソーム中に bR が取り込まれたことが確認された。得られた F4-DMPC 再構成試料 (bR/F4-DMPC) の最終濃度は UV 測定の結果より bR が約 7~8 μ M であり、収率は約 70~80 %であった。なお、この時の試料の bR 濃度の算出は天然膜中の bR のモル吸光係数を用いた。また、DMPC 再構成試料 (bR/DMPC) も同様の手順で調整し、収率も bR/F4-DMPC とほぼ同じであった。

4.2.2 測定方法

可視 UV スペクトルは、DU-7500 分光光度計 (ベックマンコールター社) で測定した。可視光照射下での bR/ F4-DMPC、bR/ DMPC のプロテオリポソームの分光測定は、光照射システム (キセノンランプ、Y52・熱カットフィルター(520~700 nm)) を用いておこなった。セルホルダーの温度は、 ± 0.03 °Cの温度安定性/加熱循環装置 (JULABO) を用いて制御した。

プロテオリポソーム中の bR の分子集合体の状態を解析するために、可視 CD スペクトルを使用した。使用機器は温度制御のための JWJTC-484 ペルチェ温度制御装置 (JASCO) を備えた円二色性分散計 J-820 (日本分光株式会社) を用いた。bR と結合したレチナールは光学活性を持っており、CD 測定により bR の二次元結晶の状態を探ることができる。天然 bR の CD スペクトルは可視領域において 530 nm の正のピークと 600 nm の負のピークからなるエキサイトン型の CD バンドが見られる。この CD バンドは bR が二

次元結晶をとる際に形成する bR の配置状態（三量体）によって現れる CD バンドであり、界面活性剤（Triton X-100 など）によって可溶化され、bR が単量体になった場合には 550 nm 付近に正のピークを持つポジティブ型の CD バンドになる。このようなスペクトルの変化を見ることで、bR の集合状態を調べることができる。測定は各スペクトルについて平均 10 回積算した。

過渡吸収測定装置は、試料を励起する励起光源であるパルスレーザーと、生成した励起状態やラジカル状態などの中間体を分光検出するためのモニター光源、およびモニター光の透過吸光度を検出する光検出部と試料部周りの光学系から構成される。なお本研究では、北海道大学の菊川峰志博士の作製の装置を用いて実験をおこなった。⁹ 通常の可視・紫外吸収スペクトルが基底状態から励起状態へ電子遷移に基づくのに対し、過渡吸収分光法では光励起によって生成した励起状態、および励起状態から反応によって生成するイオンラジカルなどの不安定中間体の電子遷移が対象であり、その時間変化が重要な知見となる。過渡吸収測定では、パルスレーザーで試料を瞬間的に光照射することで、種々の活性種を瞬間的に生成させ、それらによる光吸収を測定する。また、吸収スペクトルの形状は分子の構造や周りの媒体の廃校などのミクロスコピックな構造を反映するので、反応中間体の分子構造の変化や溶媒和などの緩和過程に関する知見も得られる。本研究では bR のプロトンポンプ機能中に現れる光機能中間体の解析を行うために、過渡吸収測定を行った。

シンクロトロン放射源を有する X 線回折測定は、フォトンファクトリー（つくば、日本）のビームライン 6A でおこなった。本稿で提示されたすべてのデータは、ビームライン 6A で得られた結果であるが、測フォトンファクトリーのビームライン 9C での再現性も確認した。^{10,11} X 線ビームの波長は 0.15 nm、検出器対サンプル距離は約 500 mm であった。X 線回折パターンは、二次元ピクセルアレイ検出器 PILATUS100K（DECTRIS、スイス）0.39 をカウントする X 線光子を用いて記録した。¹² 露光時間は 60 秒でおこなった。PILATUS100K 検出器の二次元データを FIT2D ソフトウェアを使用して一次元のデータに変換した。¹³ また散乱角は、ベヘン酸銀の回折パターンを用いて較正した。本稿では、逆数の間隔 (S) は、 $S=1/d = (2/\lambda) \sin \theta$ を使用した (d は格子間隔、 2θ は散乱角、 λ は X 線の波長)。横軸は、1 次元データを表示する。測定試料は、光学顕微鏡のための DSC 装置 (FP-84) に搭載され、これは温度制御装置として使用した。bR/ F4-DMPC は温度制御した遠心分離機 (MX-150、(株) トミー) を用いて 4 °C で 30 分間、18000 g の遠心分離によりペレット化した。¹⁴

また機能している状態での F4-DMPC と DMPC のプロテオリポソーム中の bR の構造的安定性を比較するために、次のように bR の不可逆的な光誘起変性の程度を調査した。

1、2、4、8、または 16 時間 30 °C で、可視光を用いて再構成 bR に連続照明した後、各サンプルを迅速に冷却し、4 °C の暗所で 1 晩インキュベートし、その試料の吸収スペクトルを暗所で測定した。光誘起変性の程度は、光照射前に取得した吸収スペクトルとインキュ

バージョン後の吸収スペクトルの吸収極大波長における吸光度を分割することにより推定した。

4.3 結果と考察

図 4.3.1 に示すように、上述の再構成手順で調製し得られた紫色の懸濁液を、1 時間 100000 g で超遠心分離したところ、均質な紫色の沈殿と透明な上清へ完全に分離した。これは bR 分子が完全に F4-DMPC のリポソーム中に埋め込まれていることを示し、bR および F4-DMPC で構成されるプロテオリポソームの作成に成功したことを意味する。



図 4.3.1 F4-DMPC 再構成 bR の懸濁液（左：遠心分離前、右：遠心分離後）

得られた bR/F4-DMPC プロテオリポソーム懸濁液の 2 °C における可視光照射下、暗中之での可視 UV スペクトルの結果を図 4.3.2 に示す。吸収極大 λ_{\max} の波長は、暗中で 570 nm に観察され、光照射時には 570 nm から 580 nm までシフトし、また新たに 410 nm 付近にピークが現れた。この 410 nm のバンドは bR の M 中間体に起因し、照射を停止した後に

は可逆的に 570 nm の吸光度の増加と同時に 410 nm のバンドは消失した。可視光の照射による λ_{\max} の大きなレッドシフトが F4-DMPC リポソーム中の bR 分子が天然紫膜中のように暗順応状態から明順応状態への光変換能力を保持していることを指示する。なお、暗順応および明順応状態で、F4-DMPC 中の bR の λ_{\max} がシフトした。F4-DMPC 中の bR の λ_{\max} が、天然紫膜中の bR に対して約 8 nm のレッドシフトを示した。一方で、DMPC リポソーム中の bR は約 3 nm のブルーシフトが観察され、F4-DMPC と DMPC リポソーム中の bR 分子の λ_{\max} の差はおよそ 11 nm であった。bR の λ_{\max} はレチナールポケット周辺の構造に強く依存することは過去の多くの実験事実や理論解析によって実証されており、bR/ F4-DMPC のプロテオリポソームの著しいピークシフトは、レチナールポケット近傍の構造変化に起因するものと考えられる。¹⁵ bR の λ_{\max} の値はレチナールポケット周辺の静電環境を反映しているため、 λ_{\max} の差を担うもっともらしい構造特性は、発色団およびその周辺におけるいくつかのアミノ酸残基の局所構造の配置、例えばレチナールおよびアミノ酸残基との間の相対的な距離である。詳細は現時点では明らかではないが、人工脂質膜に再構成することによりレチナールポケット周辺の局所構造的配置の摂動は、bR/ F4-DMPC と bR/ DMPC の間で異なることになる。

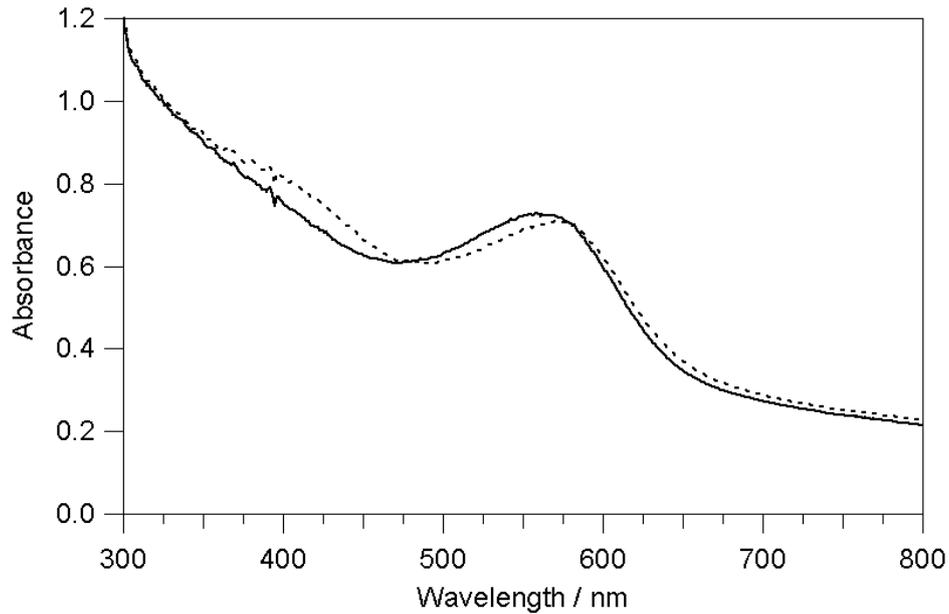


図 4.3.2 bR/F4-DMPC の紫外可視吸収スペクトル

(2 °C、実線：暗、破線：光照射下)

次に F4-DMPC リポソームにおける bR 分子の四次構造を調べるため、bR/F4-DMPC プロテオリポソームの可視の CD スペクトルを測定した。2 °C (ゲル相)、30 °C (液晶相) における代表的なスペクトルを図 4.3.3 に示す。ゲル相における 2 °C の CD スペクトルは、天然紫膜に非常に類似した正のピークと負のピークから成る特徴的なエキサイトンバンドを示した。これは F4-DMPC 中の bR 分子が、PM やゲル相における bR/DMPC のように三量体構造をとっていることを意味している。^{4,5,16-19} また図に示すように、30 °C への温度上昇でも可視領域において有意なスペクトルの変化は観測されなかった。これらの CD の結果は液晶相であっても bR 分子の三量体構造が F4-DMPC リポソーム内に保持されていることを示す。これは通常の DMPC などの異なるアシル長の飽和 PC の三種類のリ

ポソームに再構成した場合に顕著に現れた、脂質二重膜のゲル相から液晶相への転移を介し生じた三量体の解離とは対照的である。^{4,5,18,19}

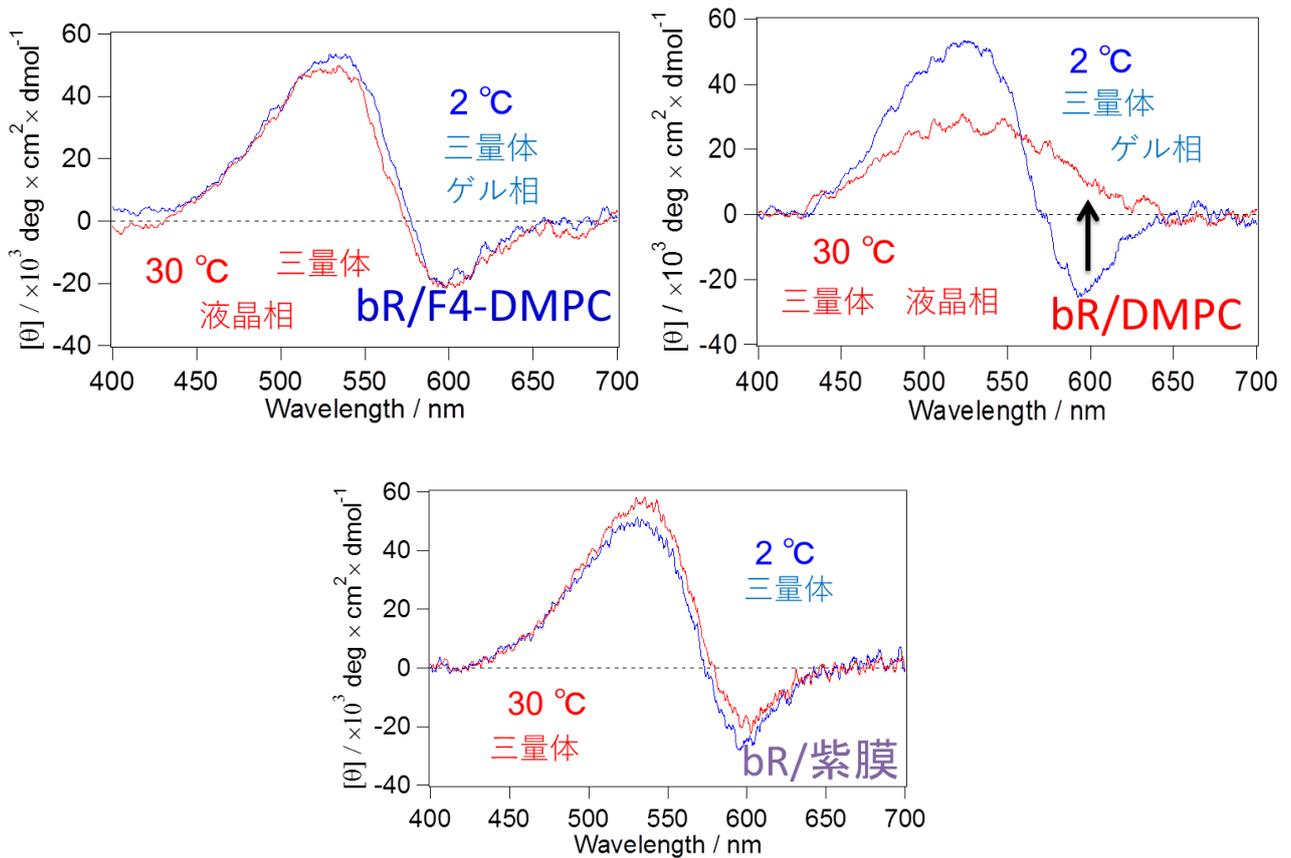


図 4.3.3 bR/F4-DMPC, bR/DMPC, bR/紫膜 の可視円二色性スペクトル
(青線：2 °C、赤線：30 °C)

bR/ F4-DMPC リポソームの高次構造のさらなる分析のために、X線回折測定をおこなった。図 4.3.4 の 2 °Cでの回折パターンに示すように、強いピークが 0.321 と 0.372 nm⁻¹で観測された。2つの回折ピークの位置が、天然の紫膜の 0.319 及び 0.370 nm⁻¹における

ものと非常に近い。(1,1) と (2,0) はそれぞれにゲル相に依存している反射である。^{20,21}

bR/ F4-DMPC のリポソームに対して得られた 6.21 nm での格子定数は、天然紫膜の値 6.27 nm に非常に類似していた。天然類似の格子構造の形成は bR/DMPC リポソームのゲル相においても報告されているが、液晶相においては天然類似の高次構造を失われる。

bR/F4-DMPC リポソームの回折パターンは液晶相である 30 °Cまで温度上昇をおこなっても有意な変化を示さず、これは bR/F4-DMPC リポソームが相転移後の液晶相であっても二次元結晶構造を保持したことを意味する。これは、相転移温度以上の三量体構造の有意な変化を示さない可視 CD スペクトルの結果と非常に一致した。

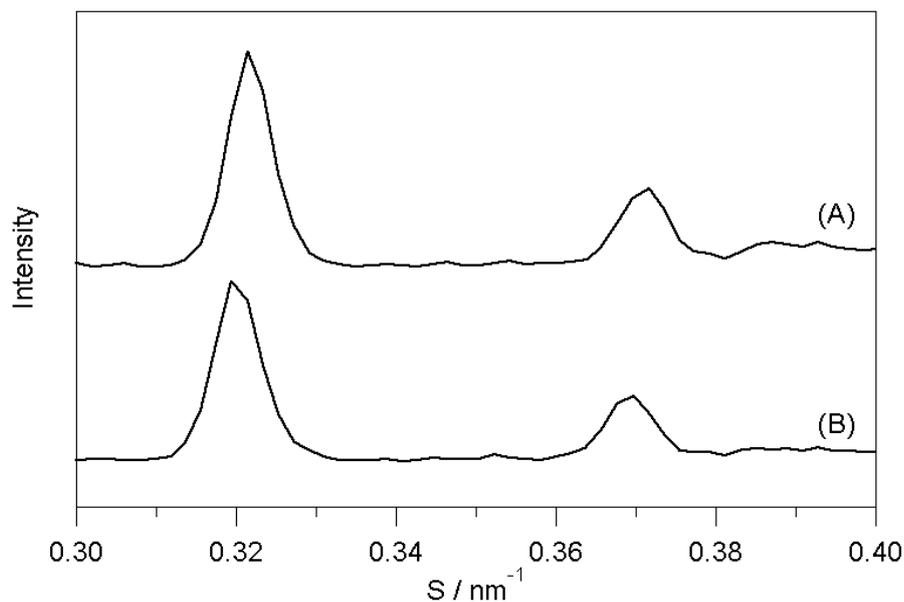


図 4.3.4 bR/F4-DMPC の WAXD パターン (A : 2°C、B : 30°C)

次に過渡吸収（レーザーフラッシュフォトリシス）により F4-DMPC リポソーム中の bR の機能中間体の解析をおこなった。図 4.3.5 に 2 °C におけるそれぞれ代表的な M 中間体、O 中間体、基底状態にあたる 410 nm、640 nm、560 nm の過渡吸収の変化を示した。これらの結果は、光サイクルが数倍に伸長しているが、天然紫膜のものに非常に近く、これは bR/ F4-DMPC リポソームは、天然紫膜類似のプロトンポンプ活性を有することが示唆された。この光サイクルの時間の伸長は、再構成 bR における構造的な変化が天然の bR と異なり、人工膜でのタンパク質-タンパク質間相互作用が弱いことが起因となっていることが考えられる。このことから bR/ F4-DMPC リポソームの長寿命化した光サイクルをもたらしていることが示唆された。ゲル-液晶相転移を超える温度であっても、同様の光による 410、560、640 nm での吸光度の変化を観測した。これらの結果は、ゲル相、液晶相の両方において、UV-VIS、可視 CD スペクトルや X 線回折測定の結果と一致しており、F4-DMPC リポソーム中に再構成のされた bR 分子は、天然類似の光サイクルを持つことを意味する。

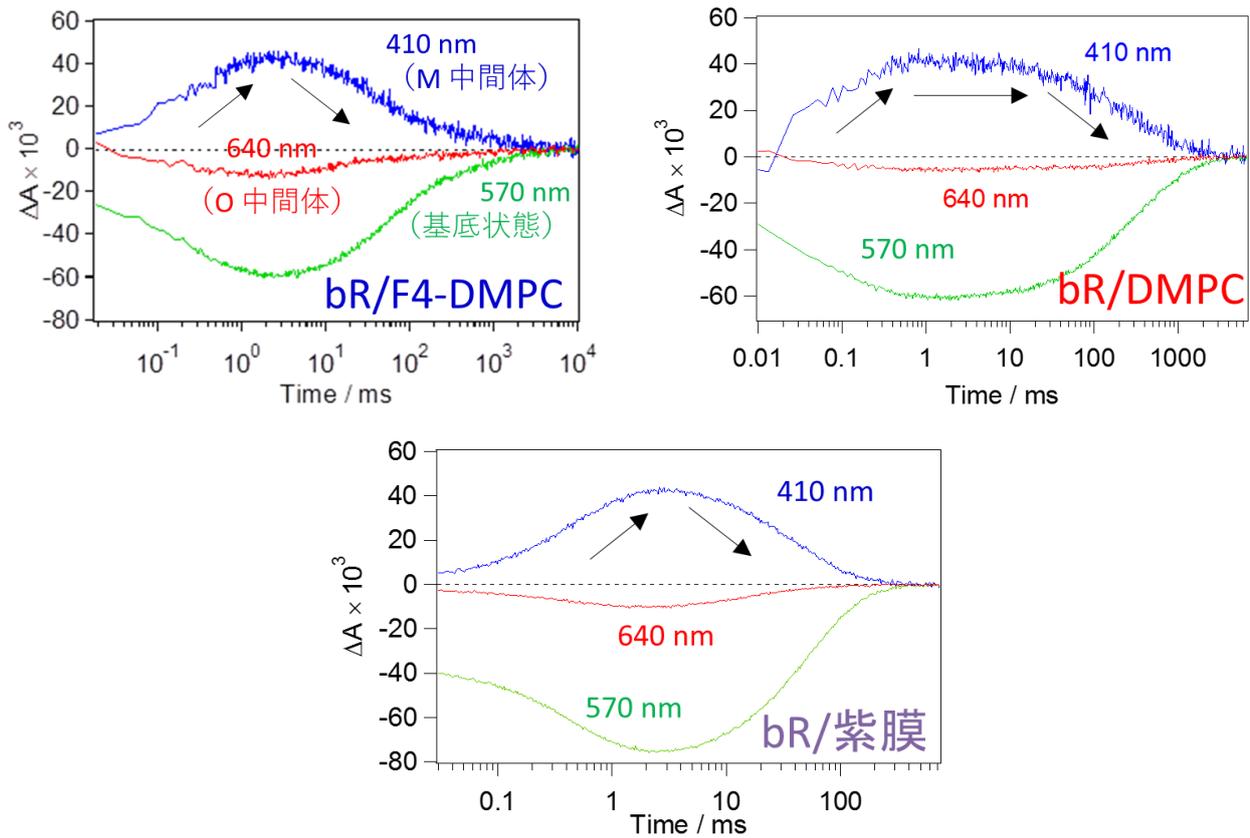


図 4.3.5 bR/F4-DMPC, bR/DMPC, bR/紫膜 の光照射による時間に対する吸光度変化

(2 °C、 $\Delta A=410 \text{ nm}$, 560 nm , 640 nm)

また転移後の 30 °C の過渡吸収の差スペクトルを図 4.3.6 に示す。脂質の相転移後であっても、2 つの M 中間体の成分 (M1、M2) の λ_{max} は 410 nm の値でほぼ一定であった。これは相転移に誘発されて生じた bR/DMPC リポソームの後半の M2 中間体のブルーシフトと全く対照的であった。⁴ これは DMPC の疎水鎖中の末端ブチル基中の 9 個の水素原子のフッ素原子への置換が、DMPC リポソーム内の望ましくない非天然構造への変化を抑える効果を示したことを意味すると考えられる。^{4,5}

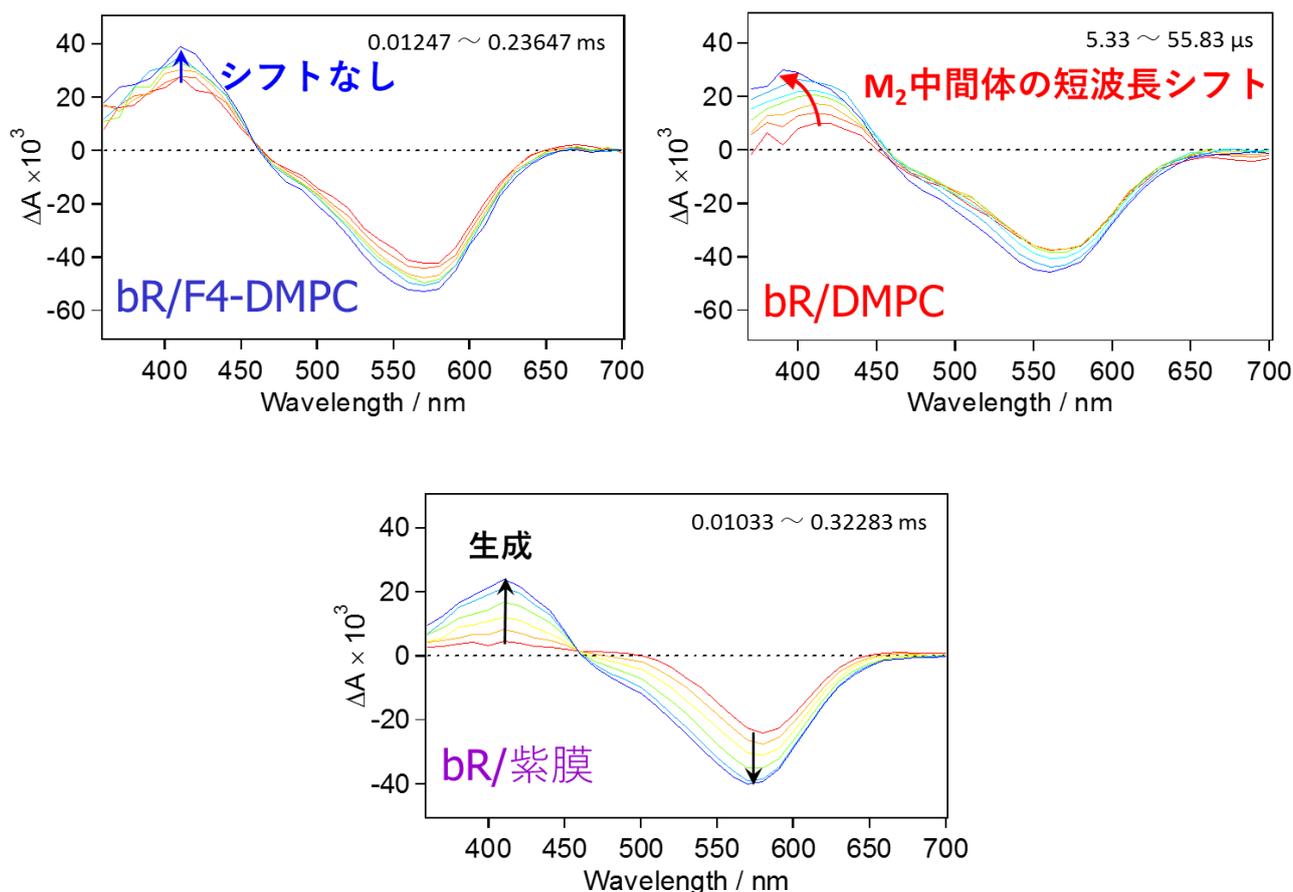


図 4.3.6 bR/F4-DMPC, bR/DMPC, bR/紫膜 の過渡吸収差スペクトル

(M 中間体の生成過程)

横山らは、DMPC に再構成した bR 分子が液晶相においてプロトマーに分解し、元々の bR の光反応を誘発する可視光の連続照射によって誘発される不可逆的な変性を受けることを報告している。⁵ そこで F4-DMPC と DMPC に再構成した bR の構造安定性を比較するために、液晶相の 30 °C において光照射下での変性実験をおこなった。この時の不可逆的な変性成分は、1~16 時間光照射をおこなった光照射前後の 560 nm での吸光度の変化を推定した。その結果を図 4.3.6 に示した。bR / DMPC の不可逆的な変性成分が徐々に照射時間

とともに増加し、16 時間で約 30 %に達した。一方、bR / F4-DMPC では 16 時間照射した場合の変性成分は約 8 %であり、bR/DMPC に比べ、はるかに安定性が向上したことを示している。またこの時の安定性は天然状態の紫膜の照射下での最大約 60 °C以下における極めて安定な状態には及ばないものの、液晶相中の bR/F4-DMPC の高次構造が天然類似の構造を取り、二次元結晶構造を形成していることが大きな要因であると推測される。²²⁻²⁵

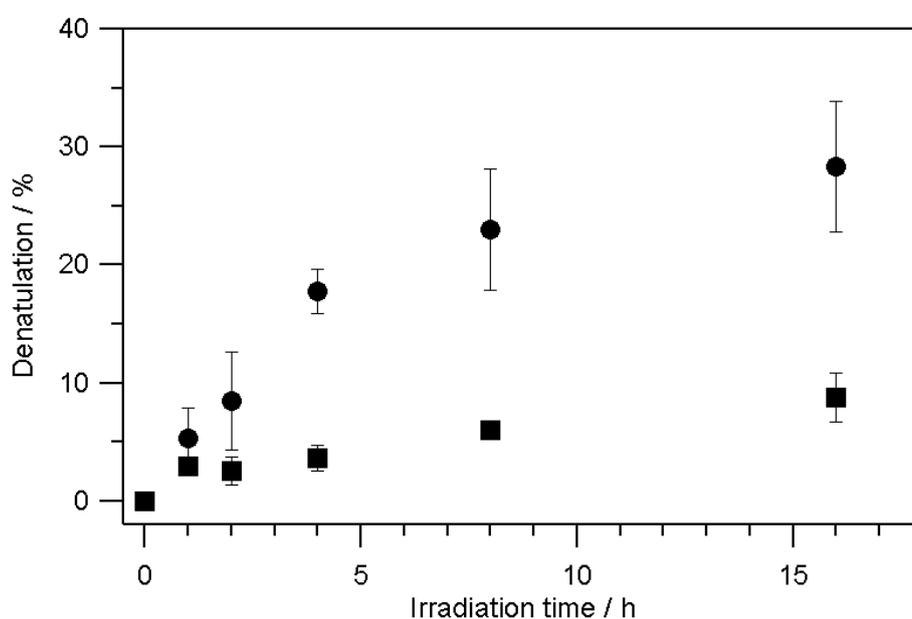


図 4.3.6 光照射時間に対する光誘起不可逆成分の増加

(● : bR/DMPC、■ : bR/F4-DMPC)

本章では、フッ素化リン脂質 F4-DMPC への膜タンパク質 bR の再構成を、非フッ素化リン脂質 DMPC と同様の手順で調整する事により再構成することに成功した。人工脂質膜への再構成として DMPC の場合と比較し、得られた bR/F4-DMPC の最も重要な特徴は脂質の相転移後の液晶相においても、bR 分子の集合状態が三量体で維持されることである。いくつかのグループは、紫膜中の bR 分子が加熱、塩基性環境下または可溶化することにより、二次元結晶構造の喪失を引き起こし、不可逆的な光誘起変性を受けることを報告している。²⁶⁻³⁰ bR 分子集合体の構造的な順序は、bR の機能の光駆動プロトンポンプ活性のために不可欠である。したがって、DMPC の疎水性鎖中の 9 つの水素原子のフッ素原子への置換は、不可逆光誘起変性することなく液晶相中の bR 分子の三量体の二次元格子の形成をもたらすといった非常に重要な役割を果たすことが示唆された。

では液晶相において F4-DMPC リポソーム中の bR 分子が三量体の二次元格子構造を保持するのはなぜだろうか？ F4-DMPC 再構成膜中における bR の三量体形成の駆動力として考えられる要因の候補に、F4-DMPC の持つフルオロカーボンによって誘発される、F4-DMPC 分子と bR 分子との親和性の低下が挙げられる。これまでの *IT-A* 測定の結果より、気水界面における F4-DMPC の単分子層の崩壊圧は DMPC のものよりも大きな値を示し、F4-DMPC 脂質膜の高い安定性（剛直性）が示唆されている。Santaella と Vierling は似た報告で、アルキル鎖の末端がフッ素化されたフッ素化 PC 膜の剛直効果に関する報告をしている。彼らは二分子膜の流動性がゲル相においてはフッ素化 PC 膜、非フッ素化 PC 膜共にほとんど影響を受けないことを明らかにし、一方で液晶相においては従来の PC

膜よりもフッ素化された鎖を持つフッ素化 PC 膜は流動性が減少すると報告している。また篠田らの分子動力学シミュレーション研究では、フッ素化 PC 二分子膜の大部分が制限されたゆらぎと横拡散の動きを観測した。これらの結果は、ゲル相から液晶相への主転移後においても、フッ素化された脂質二重膜は、ゲル相の物理的特性を保持することを示唆している。³¹ このことは、Schuy らによって報告された、6 炭素がフッ素化されたメチレン基を有する DPPC (F6-DPPC) の膜構造特性と基本的に一致するだろう。彼らは FT-IR 分光法、偏光解析法、および AFM を用いて、ゲル相から液晶相転移の間に、相対的な脂質二重膜の厚さおよび相対面積の変化の両方が DPPC よりも F6-DPPC について実質的に小さい値を示すことを明らかにしており、本研究で検討した F4-DMPC 二重膜は、以前に報告されたフッ素化された PC の例の特性と類似の物理的および構造的特性を有していることがもっともらしいと考えられる。また F4-DMPC リポソームに再構成された bR 分子は、膜の流動性の高い液晶相においてもゲル相のように二次元結晶構造を維持することが示唆された。

また別の候補として、F4-DMPC と bR 分子の分離は、タンパク質と脂質分子の混合または非混合挙動に関連していることが考えられる。膜貫通領域中のアミノ酸残基は、疎水性の炭化水素部分の側鎖を有する。そのため、この種の膜タンパク質は生体膜における脂質二重層中に埋め込むことができる。言い換えれば、この疎水性は膜タンパク質の機能的発現や構造形成に大きく寄与する。そこで、フルオロカーボン部位が F4-DMPC のような脂質分子の炭化水素尾部の末端領域に導入されたときに、PC のリポソーム中の膜タンパ

ク質である bR 分子に何をもたらすのであろうか？フルオロカーボンは一一般的に炭化水素とは混和しない傾向があり、フルオロカーボン部分を有する両親媒性分子の集合体にも適用できると考えられている。^{32,33} 実際には、フッ素化界面活性剤は多くの場合、ミセル中の非フッ素化界面活性剤から分離される傾向がある。^{34,35} またフッ素化および非フッ素化リン脂質の混合二重膜は、定性的に 2 成分の相分離の傾向を示している報告もある。³⁶⁻³⁹ また熱量分析の結果から、F4-DMPC および DMPC から構成される混和しない混合二重膜の炭化水素とフッ素化領域間の相互作用の低さは支配的な要因の一つであることが示唆された。両親媒性分子の集合体における炭化水素とフルオロカーボンの分離の傾向を考えると、膜貫通領域の多くの炭化水素側鎖を有する bR 分子は、パーフルオロカーボン鎖を有する F4-DMPC と非常に不混和性である可能性が高く、これは二次元結晶構造の bR 分子集合体をもたらしていると考えられる。この考えは F4-DMPC と DMPC の非混和性の二成分混合リポソームへの bR 分子の再構成によって確かめることができる。bR 分子は二成分リポソーム中に再構成されている場合、F4-DMPC に富むドメインと DMPC に富むドメインに均等に分布しない。しかしながら、bR 分子がフッ素化脂質 F4-DMPC よりも非フッ素化脂質 DMPC とはるかに高い親和性を示すならば、bR 分子は二成分混合膜中において DMPC に富むドメインに選択的に取り込まれることが予想される。

4.4 総論

本章では、部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC への膜タンパク質 bR の再構成を試みた。F4-DMPC 再構成膜中の bR 分子は三量体を形成し二次元結晶構造をとり、天然紫膜のような光サイクルの機能を有した。bR/ F4-DMPC のプロテオリポソームの注目すべき性質は、液晶相において天然類似の構造や機能を持ち、可視光に対して高い安定性を示したことである。これは可視光照射によって著しい不可逆的変性がゲル-液晶相転移後の液晶相において誘発される DMPC リポソームの場合とは全く対照的である。部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC リポソーム中に再構成された膜タンパク質 bR は、ゲル相・液晶相ともに天然膜中の bR に類似した構造・機能を有し、非常に安定な再構成が実現した。また、特に DMPC 再構成膜では不安定であった液晶相における安定性の向上は膜タンパク質研究として非常に有益な効果であり、第 5 章では F4-DMPC 膜中において bR が、液晶相で二次元結晶構造をとる要因に関して議論する。

4.5 参考文献

1. K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 1959–1964.
2. K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 686–690.
3. T. Takagi, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.* **2011**, *132*, 427–429.
4. M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo, S. Mitaku, *Phase. Chem. Lett.* **2009**, *38*, 1134–1135.
5. Y. Yokoyama, L. Negishi, T. Kitoh, M. Sonoyama, Y. Asami, S. Mitaku, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15706–15711.
6. D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.* **1974**, *31*, 667–678.
7. M. Rehorek, M. P. Heyn, *Biochemistry* **1979**, *18*, 4977–4983.
8. T. Sasaki, M. Sonoyama, M. Demura, S. Mitaku, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1131–1137.
9. T. Kikukawa, T. Araiso, T. Shimozawa, K. Mukasa, N. Kamo, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 357–366.
10. N. Shimizu, T. Mori, N. Igarashi, H. Ohta, Y. Nagatani, T. Kosuge, K. Ito, *J. Phys.: Conf. Ser.* **2013**, *425*, 202008.
11. S. Abe, H. Takahashi, *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 515–519.

12. E. F. Eikenberry, C. Broennimann, G. Huelsen, H. Toyokawa, R. Horisberger, B. Schmitt, C. Schulze-Briese, T. Tomizaki, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **2003**, *501*, 260–266.
13. P. Hammersley, S. O. Svensson, M. Hanfland, A. N. Fitch, D. Hausermann, *Scan. High Press. Res.* **1996**, *14*, 235–248.
14. H. Takahashi, H.; Matuoka, S.; Amemiya, Y.; Hatta, I. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76*, 115–121.
15. S. Hayashi, E. Tajkhorshid, E. Pebay-Peyroula, A. Royant, E. M. Landau, E. J. Navarro, K. Schulten, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10124–10131.
16. M. P. Heyn, P. J. Bauer, N. A. Dencher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 897–903.
17. Becher, T. G. Ebrey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *69*, 1–6.
18. R. J. Cherry, U. Muller, *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 283–298.
19. M. P. Heyn, R. J. Cherry, N. A. Dencher, *Vesicles. Biochem.* **1981**, *20*, 840–849.
20. R. Henderson, *J. Mol. Biol.* **1975**, *93*, 123–138.
21. S. Hiraki, T. Hamanaka, T. Mitsui, Y. Kito, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *647*, 18–28.
22. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, S. Mitaku, *J. Biochem.* **2002**, *131*, 785–790.
23. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, M.; Mitaku, S. *Proteins* **2004**, *54*, 442–454.

24. M. Sonoyama, S. Mitaku, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19496–19500.
25. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, S. Mitaku, *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 297–301.
26. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, T. Nakano, S. Mitaku, *J. Biochem.* **2007**, *142*, 325–333.
27. Z. Dancshazy, Z. Tokaji, A. Der, *FEBS Lett.* **1999**, *450*, 154–157.
28. Y. Mukai, N. Kamo, S. Mitaku, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 755–759.
29. A. Asada, M. Sonoyama, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2011**, *75*.
30. M. Sonoyama, M. Fukumoto, Y. Kuwabara, *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 876–877.
31. H. Saito, W. Shinoda, M. Mikami, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *468*, 260–263.
32. J. H. Simons, R. D. Dunlap, *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 335.
33. P. Mukerjee, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 573–578.
34. V. Peyre, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 305–314.
35. P. Long, J. Hao, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *171–172*, 66–76.
36. D. J. Hirsh, N. Lazaro, L. R. Wright, J. M. Boggs, T. J. McIntosh, J. Schaefer, J. Blazyk, *Bilayers. Biophys. J.* **1998**, *75*, 1858–1868.
37. J. P. Rolland, C. Santaella, B. Monasse, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *85*, 135–143.
38. E. A. Smith, C. M. van Gorkum, P. K. Dea, *Biophys. Chem.* **2010**, *147*, 20–27.
39. J. M. Sturtevant, C. Ho, A. Reimann, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 2239–2243.

第5章 部分フッ素化リン脂質と非フッ素化リン脂質からなる二成分リポソームにおける膜タンパク質バクテリオロドプシンの局在性

5.1 背景

第4章では、部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC への膜タンパク質 bR の再構成を試みた結果、F4-DMPC 再構成膜中の bR 分子は三量体を形成し二次元結晶構造をとり、天然紫膜のような光サイクルの機能を有した。bR/F4-DMPC のプロテオリポソームの注目すべき性質は液晶相において、天然類似の構造や機能を持ち、可視光に対して高い安定性を示したことである。これはゲル-液晶相転移後の液晶相において可視光照射によって著しい不可逆的変性が誘発される DMPC リポソームの場合とは全く対照的であった。部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC リポソーム中に再構成された膜タンパク質 bR は、ゲル相・液晶相ともに天然膜中の bR に類似した構造・機能を有し、非常に安定な再構成が実現した。

本章では F4-DMPC 膜中において bR が、液晶相で二次元結晶構造をとる要因に関して明らかにするため、第3章と第4章の結果を踏まえ、DMPC/F4-DMPC 混合膜に着目した。第3章では DMPC と F4-DMPC の混合膜中ではそれぞれの脂質が相分離を起こし、F4-DMPC は他の物質との親和性が低い特徴を示した。この相分離を起こす DMPC/F4-DMPC 混合膜中で bR の挙動を解析することで、F4-DMPC リポソームに再構成した bR の三量体の形成に関する要因を探ることを目的とした。

5.2 試料と実験方法

5.2.1 試料の調製

組成物中の異なる 2 種の異なる二成分リポソームを、膜タンパク質再構成のために使用した。1 つは全リン脂質に対する bR の一定モル比 (150) における F4-DMPC 対 DMPC の種々のモル比を示す、 $[bR]:[F4-DMPC]:[DMPC]=1:x:(150-x)$ 。もう一つは bR の各リン脂質に対する種々のモル比での F4-DMPC および DMPC の等モル 2 成分リポソームへの bR の再構成に相当する、 $[bR]:[F4-DMPC]:[DMPC]=1:x:x$ 。純粋な F4-DMPC リポソームに bR 分子を再構成するための前の方法と同じ方法を用いて、種々のモル比の F4-DMPC および DMPC (bR / F4-DMPC / DMPC) の二成分リポソームに埋め込まれた bR の調製を行った。この方法によって得られた懸濁液はすべて、二成分の脂質混合物中のモル比にかかわらず紫色であった。また試料の収率は約 70~80 %であった。

5.2.2 測定方法

調整した試料を用いて、UV スペクトル、CD スペクトルで解析した。まず DMPC/F4-DMPC が 1:1 の混合膜再構成 bR における UV スペクトルと CD スペクトルの測定を行ない、それぞれ DMPC、F4-DMPC、天然膜における bR のスペクトルとの比較を試みた。次に様々な混合比率の DMPC/F4-DMPC 再構成 bR の UV スペクトルの最大吸収波長の変化、CD スペクトルの変化から、再構成膜中の bR の挙動の変化を観察した。

5.3 結果と考察

図 5.3.1 に紫膜 (bR/PM)、DMPC 再構成 bR (bR/DMPC)、F4-DMPC 再構成 bR (bR/F4-DMPC) の UV スペクトルの結果を示す。

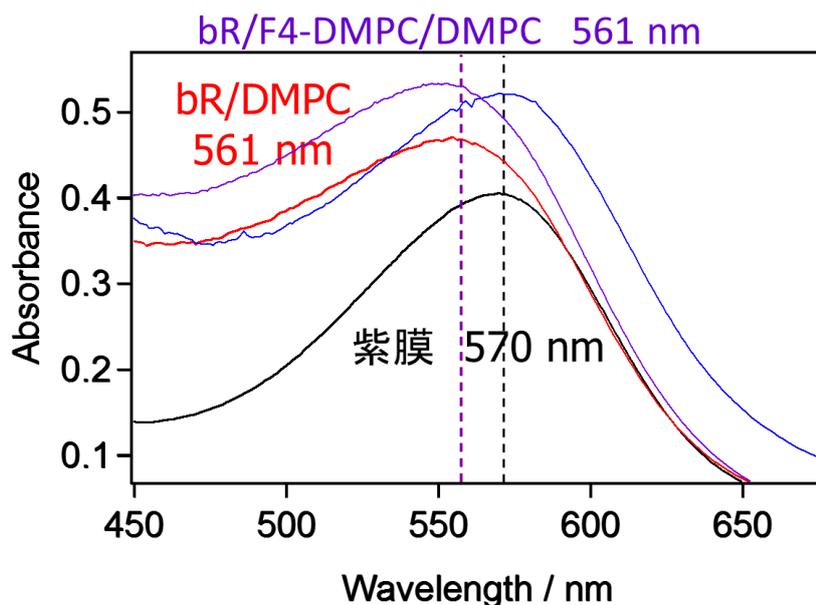


図 5.3.1 UV スペクトル (紫膜、bR/DMPC、bR/F4-DMPC、bR/DMPC/F4-DMPC)

天然紫膜中の bR は明順応状態において極大吸収波長 λ_{\max} が 570 nm であり、 λ_{\max} はレチナールポケット周辺の構造、環境の変化に対して非常に敏感に変化する。⁵ 図に示す通り、bR/PM の λ_{\max} が 570 nm であるのに対し、bR/DMPC の λ_{\max} は 561 nm に短波長シフト、bR/F4-DMPC の λ_{\max} は 575 nm に長波長シフトが観測された。この bR/DMPC と bR/F4-DMPC の λ_{\max} の大きな差は、DMPC と F4-DMPC の二成分混合膜中における bR 分子の局在分析のための有用な手がかりとなり得るだろう。

まず、DMPC と F4-DMPC の二成分混合膜中における bR 分子の分布を解析するために、

混合モル比[bR] : [F4-DMPC] : [DMPC] = 1 : 75 : 75 の bR / F4-DMPC / DMPC の UV スペクトルを可視光照射下の 30 °C で測定した。図に示すように、bR 分子を等モル比の二成分リポソームに組み込むと、プロテオリポソームの吸収ピークが 561 nm に現れた。bR / F4-DMPC / DMPC の λ_{\max} が bR / DMPC の λ_{\max} と同一であるという実験結果は、二成分混合膜中の DMPC に富むドメインへの bR 分子の優先的な再構成の指標であり、DMPC に富むドメインと F4-DMPC に富むドメインの両方への bR 分子のランダムな取り込みがおこなわれていないことが考えられる。

また、DMPC と F4-DMPC の二成分混合膜中における bR 分子の分布を解析する手法として可視 CD スペクトルを用いた。可視の CD スペクトルパターンは、その凝集状態に大きく依存し、540 nm の正のピークと 590 nm で負のピークを有する非対称エキサイトン型 CD パターンが天然 PM 中の bR の三量体構造について観察されるのに対し、高温で加熱した場合や非イオン性の界面活性剤で可溶化した場合、単量体への分解のためにブロードな正のピークに変化する。⁸⁻¹⁵ 脂質膜がゲル相において、bR / F4-DMPC および bR / DMPC の CD スペクトルには 540 nm の正のピークと 590 nm で負のピークを有する非対称エキサイトン型 CD パターンが観察される。⁶⁻⁷ 脂質膜のゲル-液晶相転移温度 T_m がそれぞれ F4-DMPC では 5.4 °C、DMPC は 23.6 °C であるが、bR / DMPC については相転移後では CD パターンが 550 nm を中心とする広い正のバンドに劇的に変化するのに対して、bR / F4-DMPC は転移後も有意なスペクトル変化は起こらない。これらの実験結果より、bR / DMPC は脂質膜の相転移に誘起された三量体の解離を受け、bR / F4-DMPC の天然型三量体構造は、液

晶相においてさえも保持される。F4-DMPC および DMPC における再構成された bR の脂質相転移誘起の CD スペクトル変化は互いに異なり、温度依存性の CD スペクトルの変化は、局在分析のための良い手がかりとなり得る。¹⁻⁴

混合モル比[bR] : [F4-DMPC] : [DMPC] = 1 : 75 : 75 の bR / F4-DMPC / DMPC の可視 CD スペクトルを図 5.3.2 に示す。bR 分子を等モル比の二成分リポソームに組み込むと温度上昇とともにスペクトルは劇的に変化し、約 590 nm の負のピークの減少および約 540 nm の正のピークのレッドシフトおよび弱化が徐々に起こり、最後に 550 nm を中心とする単一のブロードなピークが 22 °C 以上において観察された。これは二成分リポソーム中の bR 分子が三量体の熱誘起分解を受けることを示している。この解離現象のさらなる検討のために、bR / F4-DMPC / DMPC の 590 nm におけるモル楕円率 θ を温度の関数としてプロットした。図 5.3.2 に示すように、590 nm での値は低温領域でも増加し始め、約 15 °C で一定に達した。

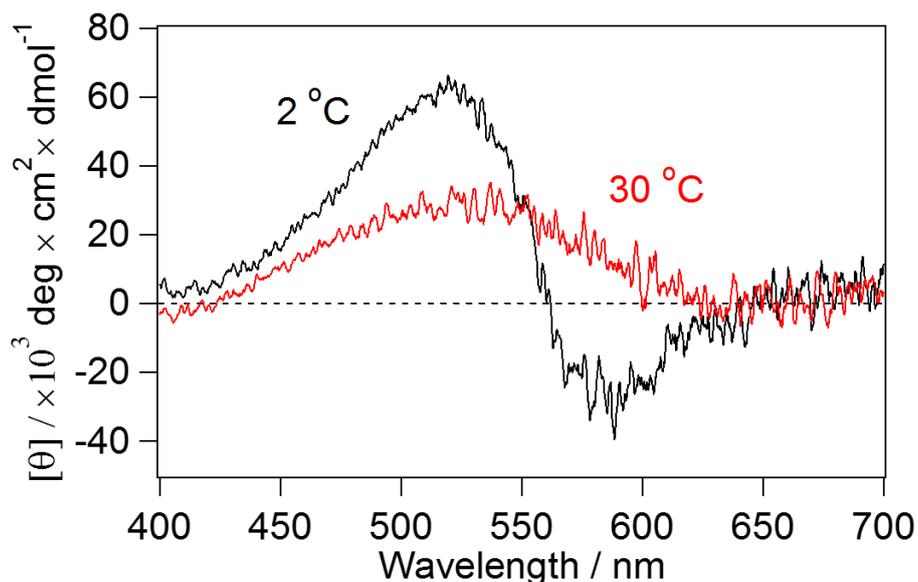
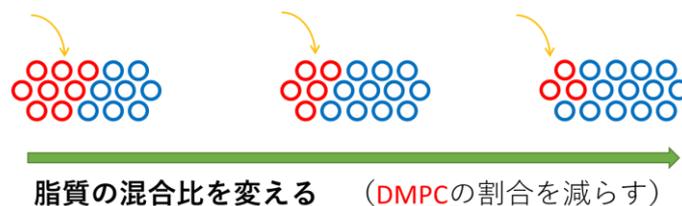


図 5.3.2 二成分リポソーム再構成 bR の CD スペクトル

二成分リポソーム中の bR 分子の $[\theta]_{590\text{nm}}$ のこれらの温度依存性変化は、DMPC の単一成分リポソーム中のそれらと非常に類似している。したがって、二成分等モル比の F4-DMPC / DMPC リポソーム中の温度依存性 CD スペクトル変化ならびに UV 吸収極大の波長から、bR 分子は DMPC に富むドメインに優先的に取り込まれ、F4-DMPC に富むドメインには存在しないことが予想される。

二成分等モル比の F4-DMPC / DMPC リポソーム ($[\text{bR}] : [\text{F4-DMPC}] : [\text{DMPC}] = 1 : 75 : 75$) を用いた実験から示された、DMPC に富むドメインにおける bR 分子の優先的な局在のさらなる検討のために、F4-DMPC と DMPC のいくつかの異なるモル比を有する二成分リポソームへの bR 分子の取り込み実験を、モル比が ($[\text{bR}] : [\text{F4-DMPC}] : [\text{DMPC}] = 1 : x : (150-x)$) となるように試料を準備した。以下に試料に関する概要を示す。(図 5.3.3)



各サンプルのbR, F4-DMPC, DMPCの混合比 (bR : Lipid = 1 : 150で統一)

• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 0 : 150	(F4-DMPC:DMPC =0:1)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 50 : 100	(F4-DMPC:DMPC =1:2)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 75 : 75	(F4-DMPC:DMPC =1:1)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 93.75 : 56.25	(F4-DMPC:DMPC =5:3)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 112.5 : 37.5	(F4-DMPC:DMPC =3:1)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 131.25 : 18.75	(F4-DMPC:DMPC =7:1)
• [bR] : [F4-DMPC]:[DMPC] = 1 : 150 : 0	(F4-DMPC:DMPC =1:0)

図 5.3.3 脂質の混合比を変えた系の再構成実験

様々なモル比のリン脂質を有する bR / F4-DMPC / DMPC のプロテオリポソームの UV-可視吸収スペクトルを 30 °Cの可視光照射下で測定した結果を図 5.3.4 に、その時の吸収極大の波長を [DMPC] / [bR] (下軸)、[F4-DMPC] / [bR] (上軸) とし、図 5.3.5 に示した。

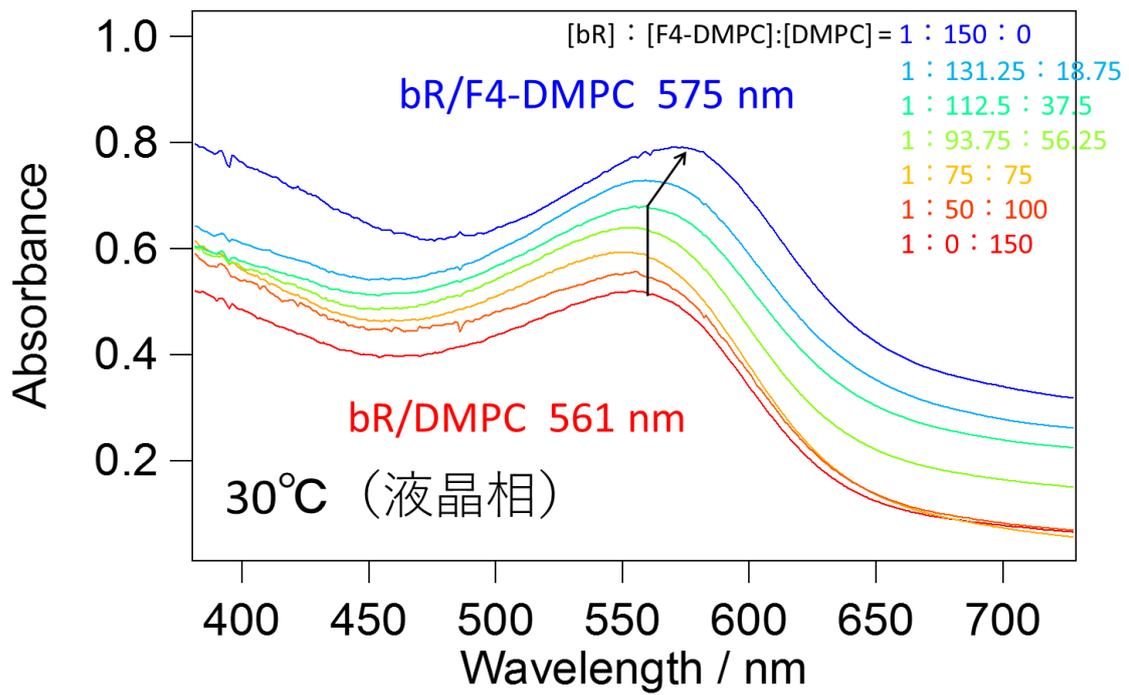


図 5.3.4 様々なモル比の bR/F4-DMPC/DMPC の UV スペクトル (30 °C)

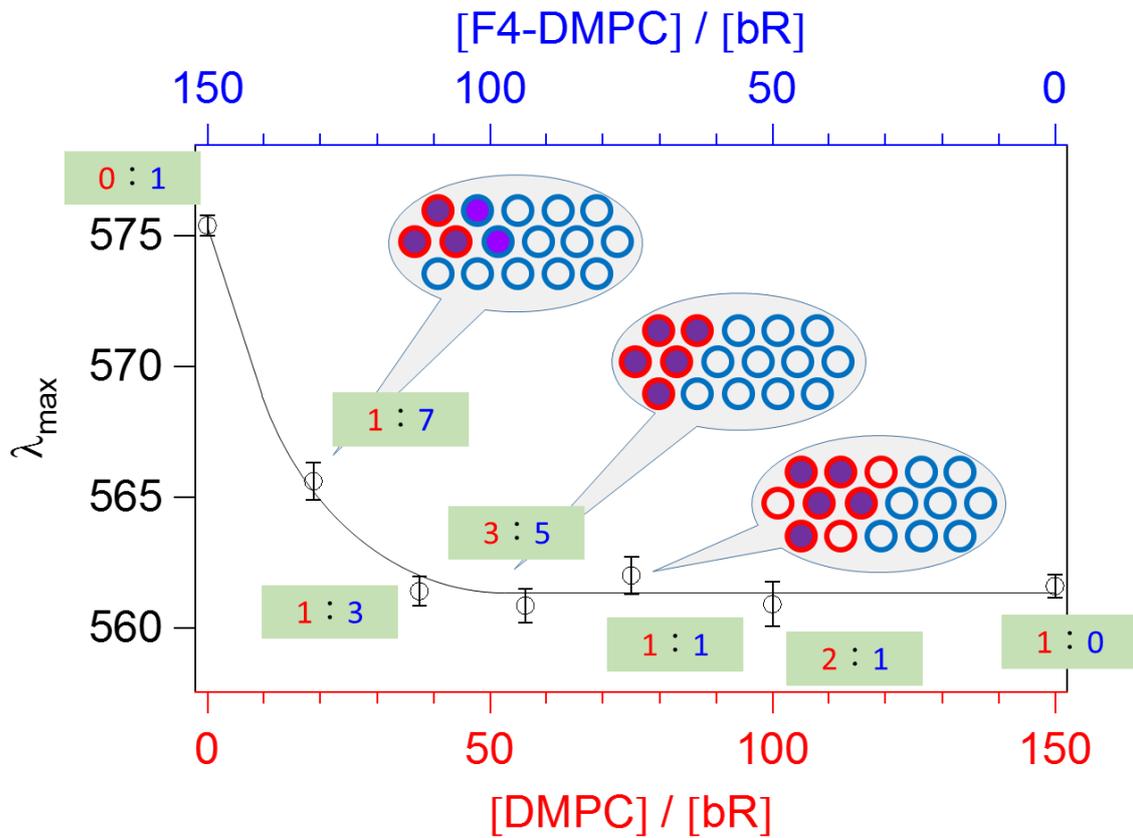


図 5.3.5 脂質混合比に対する極大吸収波長の変化

この時の[DMPC] / [bR]と[F4-DMPC] / [bR]の和は 150 で一定である。[DMPC] / [bR]が[F4-DMPC]より大きい場合、bR / F4-DMPC / DMPC の λ_{\max} は約 561 nm で一定であり、([DMPC] / [bR] = [F4-DMPC] / [bR] = 75) の bR と類似している。[F4-DMPC] / [bR]のモル比が 75 から 110 まで増加しても、[DMPC] / [bR]が 75 から約 40 に減少することに対応し、 λ_{\max} は約 561 nm で一定のままである。これらの実験結果は、F4-DMPC が二成分混合脂質膜の主要成分であっても、これらの実験条件下で bR 分子が DMPC に富むドメインに取り込まれることを示している。しかしながら、[F4-DMPC] / [bR]を 130 までさらに上昇させると、bR / F4-DMPC / DMPC の λ_{\max} は約 5 nm の顕著なレッドシフトを示し、大部分の bR 分子は DMPC に富むドメインに位置しながらも、bR 分子のいくつかの部分が F4-DMPC に富むドメインに分布していることを示す。

30 °Cでの可視 CD 測定も同じ試料についておこなった結果を図 5.3.6 に、その時の[DMPC] / [bR] (下軸) と[F4-DMPC] / [bR] (上軸) の関数として $[\theta]_{590\text{ nm}}$ の値をプロットしたものを図 5.3.7 に示した。

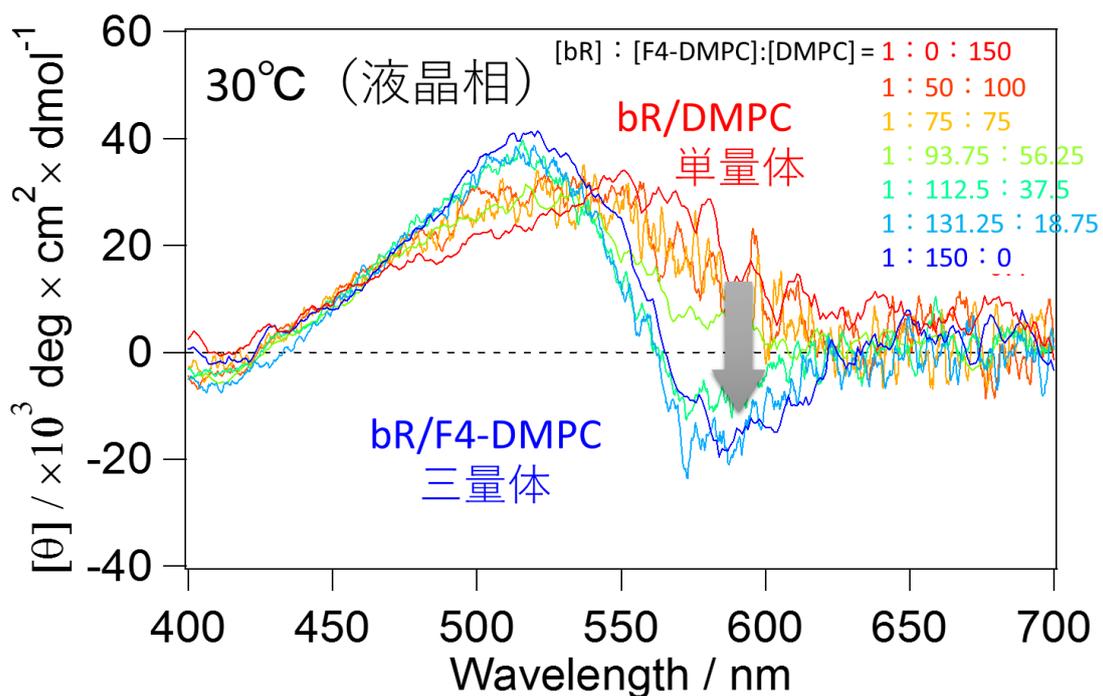


図 5.3.6 様々なモル比の bR/F4-DMPC/DMPC の CD スペクトル (30 °C)

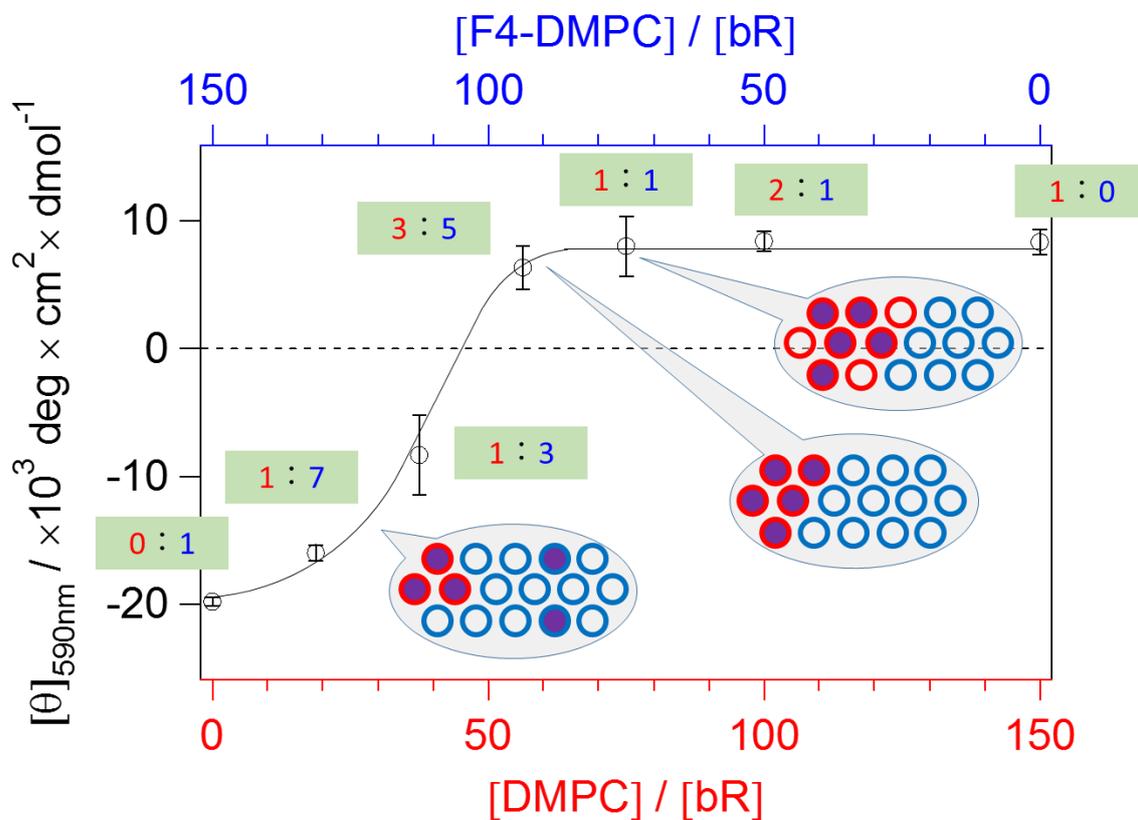


図 5.3.7 脂質混合比に対する $[\theta]_{590\text{nm}}$ の変化

[DMPC] / [bR]が[F4-DMPC]より大きい場合、bR / F4-DMPC / DMPC の $[\theta]_{590\text{nm}}$ は ~ 10 で正の値を示し、単量体 bR 分子の 530 nm の正のブロードなピークに由来し、DMPC リポソーム中の bR に非常に類似している。[F4-DMPC] / [bR]のモル比が 75 から 95 に増加しても、これは[DMPC] / [bR]の 75 から 55 への減少に対応し、 $[\theta]_{590\text{nm}}$ は ~ 10 でほぼ一定である。これらの実験結果から、bR 分子が二成分リポソームの DMPC に富むドメインに優先的に分布していると言う考えが合理的である。しかしながら、[F4-DMPC] / [bR]の ~ 110 を超えると、590 nm でのモル楕円率は、負の値に劇的に減少し、bR 三量体の形成を示す。これは F4-DMPC リポソーム中の bR 分子の特徴である。 $[\theta]_{590\text{nm}}$ のモル比依存性変化は、F4-DMPC のモル比の増加に伴う λ_{max} のレッドシフトに非常に類似している。全リン脂質に対する bR の固定モル比での再構成に関するこれらの実験結果を説明するためのもっともらしい仮説は以下の通りである。総リン脂質 (1 : 150) に対する bR の固定モル比を有する二成分リポソームにおいて、bR 分子は DMPC に富むドメインの全てが収容される bR 分子 ([DMPC] / [bR] > $\sim 40 - 50$) に対し十分大きい限り、DMPC に富んだドメインに優先的に再構成される。しかしながら、F4-DMPC のモル比の上昇による DMPC に富むドメインの減少に伴い、bR 分子の一部が DMPC に富むドメインに入ることができなくなった結果、F4-DMPC に富むドメインに強制的に分配される。

提案した仮説を検証するために、総リン脂質に対する bR のモル比が 150 から 60 に徐々に減少した状態で、F4-DMPC および DMPC の等モル比二成分リポソームを用いて別の一連の bR 再構成実験をおこなった。以下に試料に関する概要を示す。(図 5.3.8)

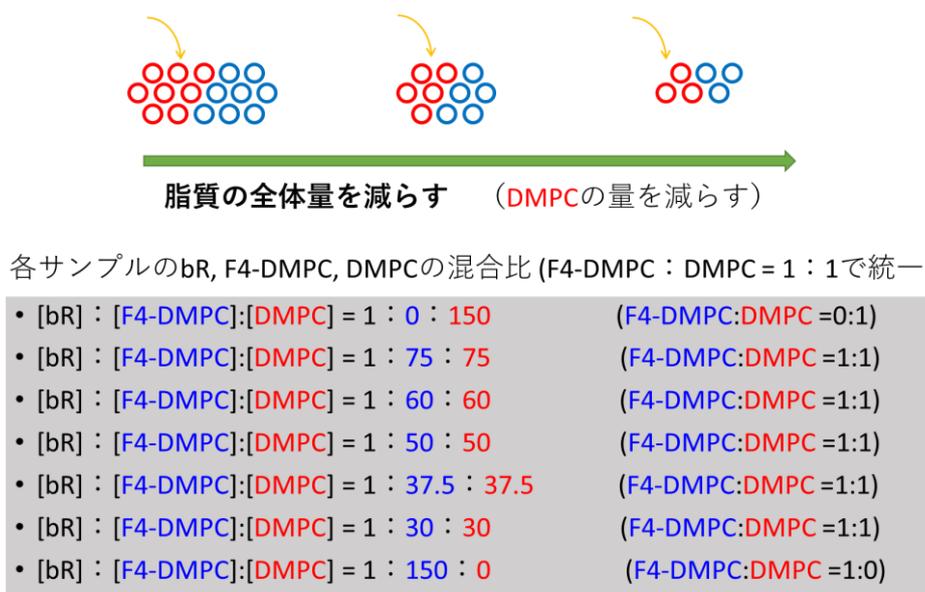


図 5.3.8 脂質の全体量を減らした系の再構成実験

様々なモル比のリン脂質を有する bR / F4-DMPC / DMPC のプロテオリポソームの UV-vis 吸収スペクトルを 30 °C の可視光照射下で測定した結果を図 5.3.9 に、その時の吸収極大の波長を [DMPC] / [bR] (下軸)、[F4-DMPC] / [bR] (上軸) とし、図 5.3.10 に示した。

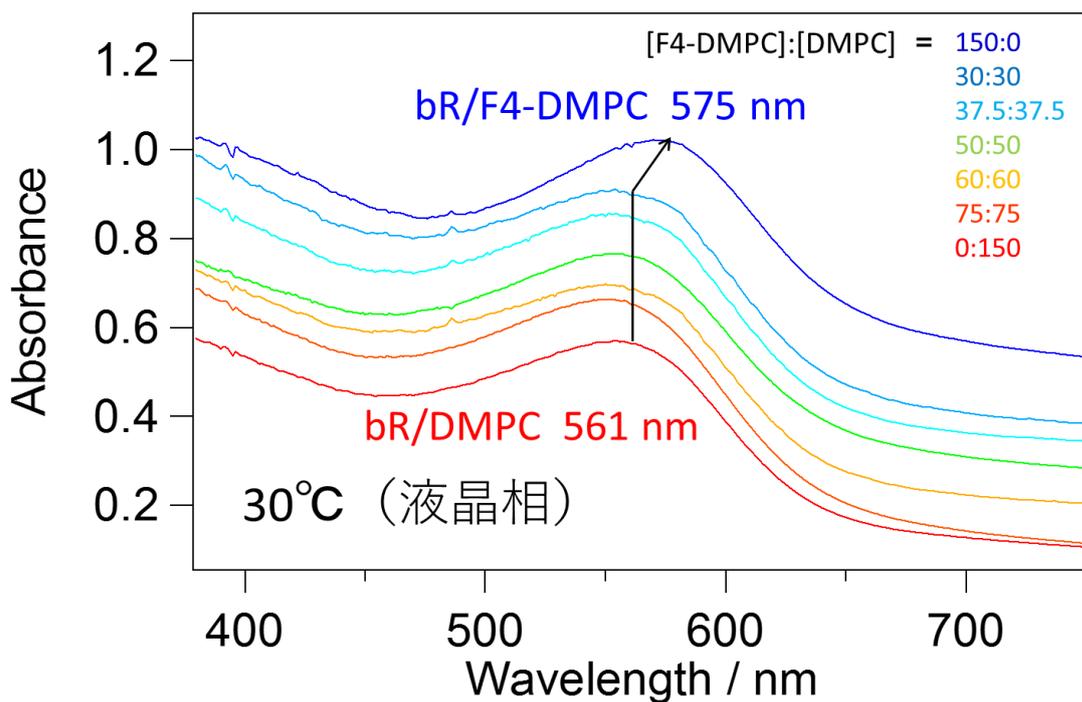


図 5.3.9 様々なモル比の bR/F4-DMPC/DMPC の UV スペクトル (30 °C)

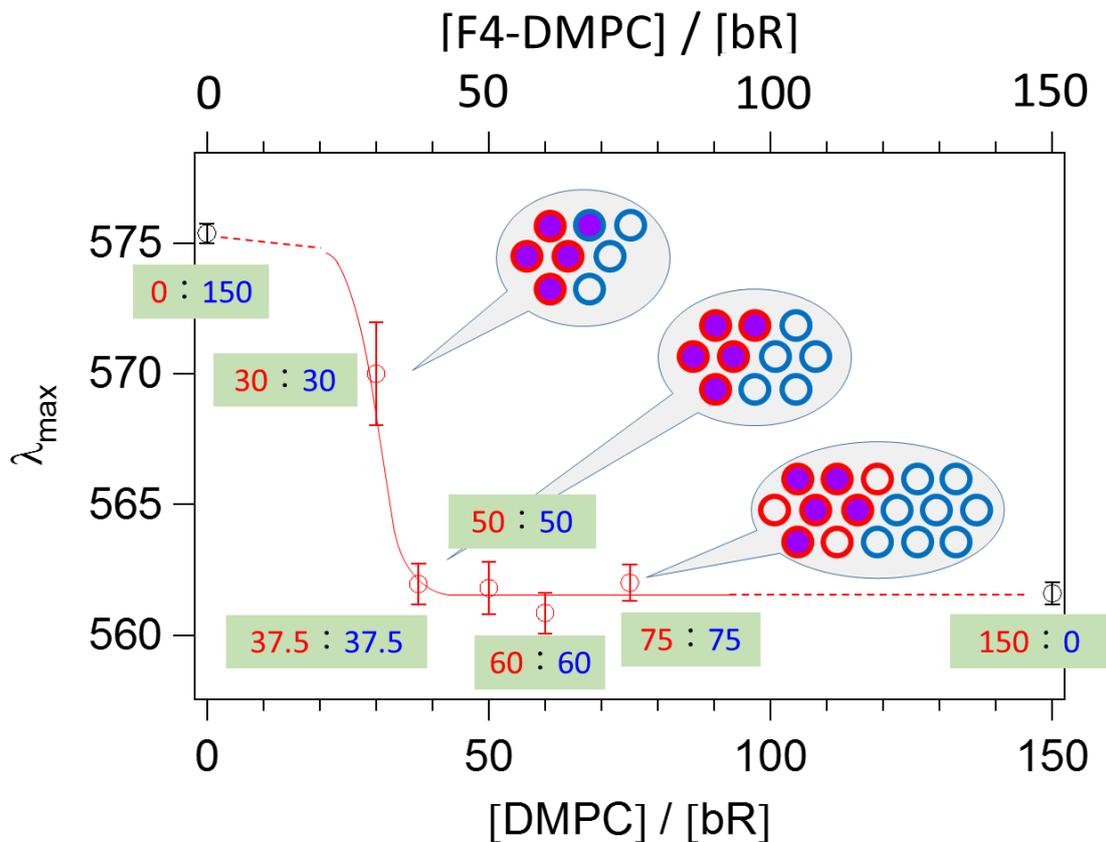


図 5.3.10 F4-DMPC および DMPC の等モル比二成分リポソーム中の λ_{\max} の変化

図 5.3.10 に示すように、bR / F4-DMPC / DMPC の λ_{\max} は、bR / DMPC と同じ波長 (約 561 nm) において、全リン脂質に対する bR のモル比が 80 に減少してもほぼ一定であり、これは $[F4-DMPC] / [bR] = [DMPC] / [bR] = 40$ のモル比に相当する。これらの結果は、 $[DMPC] / [bR]$ が約 40 を超えると、bR 分子は二成分 F4-DMPC / DMPC リポソーム中の DMPC の富むドメインに優先的に取り込まれる。しかしながら、全脂質対 bR のモル比がさらに 30 に減少すると、 λ_{\max} は約 570 nm への突然のレッドシフトを示す。この劇的な大きなレッドシフトは、F4-DMPC に富むドメインへの bR の再構成に起因するのは妥当である。等モル比二成分リポソームを全脂質に対する bR の固定モル比で行った一連の再構成実験から得られた ~40 の値は、F4-DMPC と DMPC との種々のモル比での二成分リポソームによる最初の一連の再構成実験から推定されたものとよく一致している。さらに図 5.3.6 に示すように、F4-DMPC および DMPC の等モル比二成分リポソーム中の $[\theta]_{590\text{nm}}$ の変化も、上記の λ_{\max} の変化と同様のモル比依存性の変化を示す。

30 °Cでの可視 CD 測定も同じ試料についておこなった結果を図 5.3.11 に、その時の $[DMPC] / [bR]$ (下軸) と $[F4-DMPC] / [bR]$ (上軸) の関数として $[\theta]_{590\text{nm}}$ の値をプロットしたものを図 5.3.12 に示した。

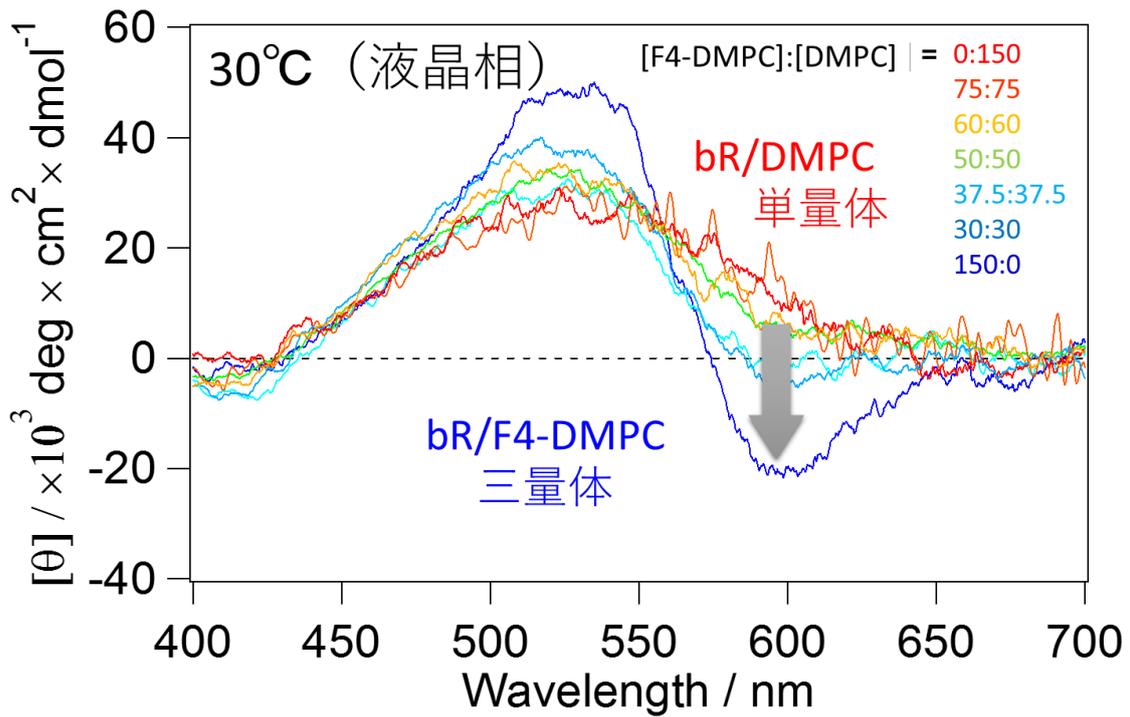


図 5.3.11 様々なモル比の bR/F4-DMPC/DMPC の CD スペクトル (30 °C)

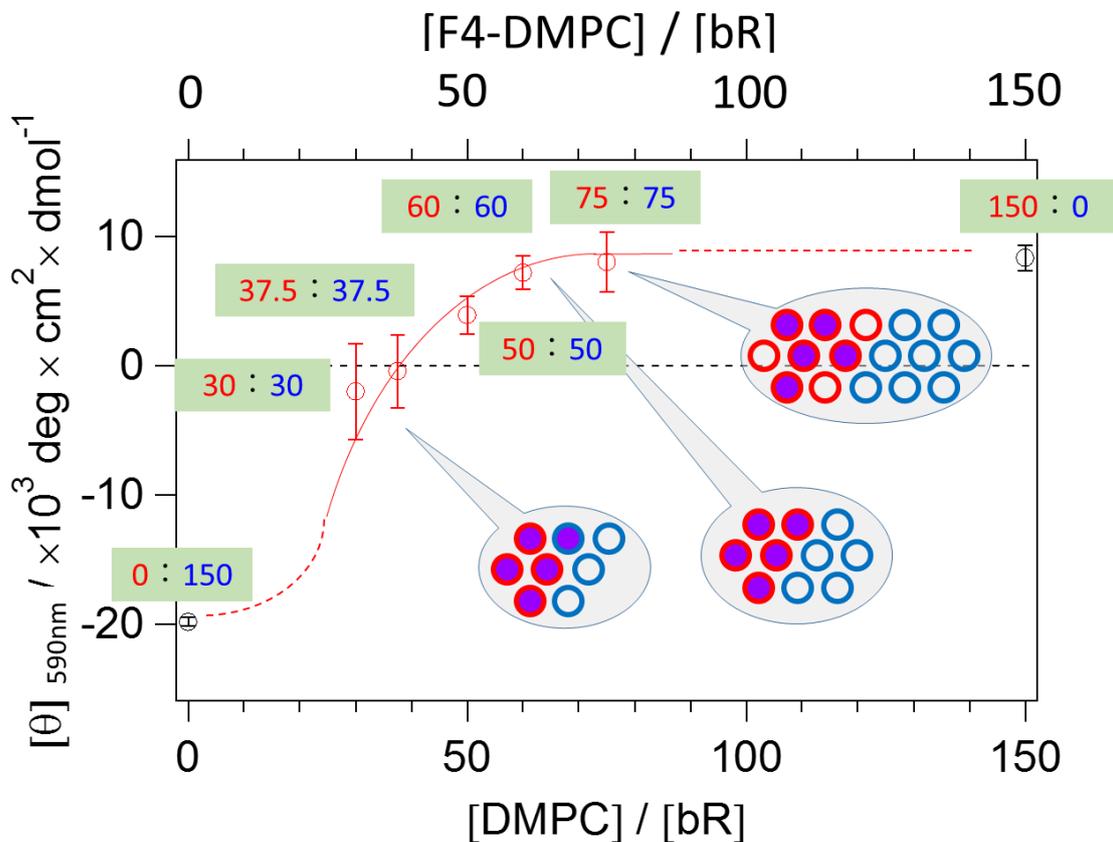


図 5.3.12 F4-DMPC および DMPC の等モル比二成分リポソーム中の $[\theta]_{590\text{nm}}$ の変化

bR / F4-DMPC / DMPC の 590 nm における CD 値は、[DMPC] / [bR] と [F4-DMPC] / [bR] が約 60 より大きい場合、bR / DMPC と同じ正のレベルでほぼ一定であり、~50 未満の [DMPC] / [bR] のモル比がさらに減少すると、徐々に負の値に減少する。これらの実験結果は、60 のモル比を超えると、bR 分子は優先的に DMPC に富むドメイン中のモノマー状態にあり、一方、[DMPC] / [bR] が約 50 以下に減少すると、bR 分子のいくつかは F4-DMPC に富んだ領域に分布し、三量体構造をとると解釈することができる。二成分 F4-DMPC / DMPC リポソーム中の bR 分子の三量体形成のモル比 [DMPC] / [bR] の閾値は、bR 再構成実験の第 1 の系列から得られたものと非常に類似しており、bR / F4-DMPC / DMPC についての λ_{\max} の分析の場合と同様である。以上より、二成分 F4-DMPC / DMPC リポソーム中の bR 分子の分布挙動に関する仮説は完全に妥当であると結論付けることができる。

二成分膜中の F4-DMPC に富むドメインへの再構成の開始点についての [DMPC] / [bR] の閾値は UV-vis 吸収測定および可視 CD 分光測定から推定された。しかしながら、2 つの異なる技術から得られる閾値は互いに非常に類似しているが、それらの間に少しの違いがある。これに関しては、上述したように再構成された bR の λ_{\max} は、単一のタンパク質分子内のレチナールポケットの局所構造および環境を反映するので、可視 CD スペクトルは bR 分子の集合状態に関連し、高次構造レベルでのより小さな変化に対してより敏感であるためである。

種々のモル比を有する二成分 F4-DMPC / DMPC リポソームへの 2 つの異なる一連の再構成実験より、二成分リポソームへの組み込み時に、bR 分子は DMPC に富むドメインが

再構成される bR に利用可能である限り、DMPC に富むドメインに優先的に局在することがわかった。二成分リポソームにおける bR 分子の DMPC に富むドメインへの優先的再構成の推進力は、F4-DMPC と DMPC との間の bR 分子との親和性の差に起因すると結論づけることが合理的である。内在性膜タンパク質とリン脂質二重層との間の主な相互作用は、膜貫通領域のアミノ酸からの側鎖の炭化水素部分とリン脂質からのアシル鎖との間の疎水性相互作用である。フルオロカーボンは、低い親和性のために炭化水素から分離される傾向があるので、DMPC のミリスチル鎖との良好な相互作用を有し、F4-DMPC の Rf-導入ミリスチル鎖との親和性がより低い。従って、二成分 F4-DMPC / DMPC リポソームの DMPC に富むドメイン中の bR 分子の優先的局在化は、bR の膜貫通セグメントの物理的性質に由来すると考えられている。

さらに、二成分 F4-DMPC / DMPC 膜における bR 分子の優先的再構成は、膜タンパク質 - リン脂質相互作用がアシル鎖中の Rf 基の導入によって変化することの指標でもある。水面上の部分フッ素化脂肪酸単分子膜の物性に及ぼす Rf 鎖の長さ依存性を考慮すると、異なる Rf 鎖長を有する Rf 含有ミリスチン酸の表面圧 (π) - 表面積 (A) および表面電位 (ΔV) - 表面積 (A) 等温線の測定により、アシル鎖に長さの異なる Rf 基を導入することにより、リン脂質二分子膜の物理的性質と膜タンパク質との分子相互作用が様々に変化する可能性がある。実際、熱量測定から、異なる Rf 鎖長を有する DMPC のいくつかのアナログ分子間の相転移温度の劇的な差異が明らかにされている。¹⁶ さらに、bR と F4-DMPC との低い親和性は、純粋な F4-DMPC リポソーム中の bR 分子の三量体形成を液晶相において

も生じさせると考えられ、これは非フッ素化リン脂質リポソーム中の bR 三量体の相転移誘起分解とは大きく異なる。³⁻⁴ 部分的にフッ素化されたリン脂質に特徴的な膜タンパク質 - リン脂質複合体の物理的特性は、*in vitro* での膜タンパク質集合体の自発的構築のための新しいアプローチを開くことができ、より長い Rf 基を有するリン脂質を使用することにより、おそらくより効果的であるだろう。

5.4 総論

本章では、フッ素化リン脂質 F4-DMPC リポソーム中の膜タンパク質バクテリオロドプシン bR がゲル相及び液晶相において三量体の二次元結晶構造を形成する要因を探るため、F4-DMPC と非フッ素化リン脂質 DMPC との混在する混合膜への bR の再構成をおこなった。F4-DMPC と DMPC からなる二成分リポソームにおける 2 系列の bR 再構成実験を通して、部分的にフッ素化されたホスファチジルコリンと非フッ素化されたホスファチジルコリンとの間のリン脂質と膜タンパク質との親和性の顕著な差異があることがわかった。さらに、部分的にフッ素化されたリン脂質の膜タンパク質との親和性は、通常非フッ素化リン脂質よりも低く、これは膜タンパク質の分子集合を促進すると考えられる。膜タンパク質とのリン脂質の分子相互作用における重要な変化は、疎水性アシル鎖の末端領域に Rf 基を導入することによって誘導され、部分フッ素化リン脂質および脂肪酸の膜特性は Rf 鎖長に大きく依存するため、膜タンパク質 - リン脂質相互作用がリン脂質のアシル鎖における Rf 鎖長に依存して制御され得ることを強く示唆している。

5.5 参考文献

1. R. J. Cherry, U. Muller, *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 283-98.
2. M. P. Heyn, R. J. Cherry, N. A. Dencher, *Biochem.* **1981**, *20*, 840-9.
3. M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo, S. Mitaku, *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 1134-1135.
4. Y. Yokoyama, L. Negishi, T. Kitoh, M. Sonoyama, Y. Asami, S. Mitaku, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15706–15711.
5. S. Hayashi, E. Tajkhorshid, E. Pebay-Peyroula, A. Royant, E. M. Landau, J. Navarro, K. Schulten, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10124-10131.
6. B. Becher, T. G. Ebrey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *69*, 1-6.
7. M. P. Heyn, P. J. Bauer, N. A. Dencher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 897-903.
8. S. Hiraki, T. Hamanaka, T. Mitsui, Y. Kito, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *647*, 18-28.
9. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, S. Mitaku, *J. Biochem. (Tokyo)* **2002**, *131*, 785-790.
10. Y. Yokoyama, M. Sonoyama, S. Mitaku, *Proteins* **2004**, *54*, 442-454.
11. A. Asada, M. Sonoyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 376-378.
12. N. A. Dencher, M. P. Heyn, *FEBS Lett.* **1978**, *96*, 322-326.
13. Y. Mukai, N. Kamo, S. Mitaku, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 755-759.

14. T. Sasaki, M. Sonoyama, M. Demura, S. Mitaku, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1131-1137.
15. M. Sonoyama, M. Fukumoto, Y. Kuwabara, *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 876-877.
16. T. Hasegawa, T. Shimoaka, N. Shioya, K. Morita, M. Sonoyama, T. Takagi, T. Kanamori, *Chem. Plus. Chem.* **2014**, *79*, 1421-1425.

第6章 結論

天然の生体膜中に膜タンパク質を含む生体分子集合体としての脂質膜ドメインが見出された実験事実は、膜タンパク質の構造・機能・物性の本質的な理解のために、機能場としての脂質二重膜の特徴や役割を分子レベルで研究することの重要性、必要性を改めて強く示すものであり、脂質・タンパク質相互作用の観点からの膜タンパク質研究が強く望まれている。しかしながら、従来の界面活性剤および脂質を用いた水中での膜タンパク質の取り扱いが非常に困難であるため、膜タンパク質の三次元構造の実験データはこれまで水溶性タンパク質とは対比的に非常に限られている。この困難を克服し、膜タンパク質の機能、構造および動態のさらなる分析をおこなうために、適切な環境で膜タンパク質を調製する新たな界面活性剤および脂質の設計および合成は、長い間望まれてきた。そこで最も有望なアプローチの1つとして、両親媒性分子中のフッ素原子による水素原子の置換に着目し、本研究ではフッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への応用を目標に、フッ素導入量を調節した部分フッ素化リン脂質を用いて膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) の再構成を行い、その構造や機能を解析すること、またフッ素化されていない再構成した系との比較からフッ素化の影響を調べ、フッ素化リン脂質が膜タンパク質の再構成基材として有用であるかを評価することを目的とした。

第2章では、部分的なフッ素化飽和 PC の一連の物理化学的研究の第一段階目として、1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine(DMPC)のミリストイル基のブチルセグ

メントをパーフルオロ基に置き換えた 1,2-di(11,11,12,12,13,13,14,14,14-nonafluorotetradecanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (F4-DMPC)を新たに合成し、示差走査熱量測定 (DSC)、広角 X 線回折 (WAXD)、面圧面積 (Π -A) 測定、 Π -e 測定、2-dimethylamino-6-lauroylnaphthalene (LAURDAN)を用いた蛍光測定など、種々の物性評価をおこなった。フッ素化リン脂質 F4-DMPC は非フッ素化リン脂質 DMPC と比較すると、より高い安定性を示し、疎水性/親水性界面領域におけるより高い極性を持つこと、低い相転移温度を持つことや、大きな占有面積を持つといった、いくつかの特徴的な熱物性及び界面特性を示した。

第 3 章では、実際の生体膜を模倣するために、フッ素化された分子と膜脂質の混合物が、生物物理学的研究における内在性膜タンパク質のためのマトリックスとして期待し、フッ素化された分子と膜脂質との間の詳細な相互作用が、このような研究によって得られた結果の適切な解釈のために明確にする必要があると考え、水和二層システムで F4-DMPC と DMPC との間の相溶性の定量的評価を行うために、正則溶液理論を用いて示差走査熱量測定 (DSC) 測定によって得られた転移温度データを解析した。DMPC と F4-DMPC の混合物の相図の固相線と液相線を正則溶液理論に基づくフィッティング手順を使用して測色データから求めた結果、フィッティングは非理想のパラメータの値を示し、混和性ギャップを有することを明らかにした。非理想のパラメータの値が比較的大きく、混合物は各成分に富むドメインを形成する傾向があることが示唆された。

第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、*Halobacterium salinarum*中に存在し7回膜貫通型ヘリックスで、光駆動プロトンポンプを有するといった、膜タンパク質の中でも最もよく特徴付けられた膜タンパク質のひとつであるバクテリオロドプシン (bR) を、F4-DMPCのリポソームへ再構成を試みた。F4-DMPCリポソーム中に再構成されたbRの構造と機能の特性は、UVスペクトル測定、可視円偏光二色性(CD)測定、レーザーフラッシュフォトリススおよびX線回折で調査し、対応する非フッ素化リン脂質DMPCで再構成のbRの場合との比較をおこなった。その結果、F4-DMPC再構成膜中のbR分子は三量体を形成し二次元結晶構造をとり、天然紫膜のような光サイクルの機能を有した。bR/F4-DMPCのプロテオリポソームの注目すべき性質は液晶相において、天然類似の構造や機能を持ち、可視光に対して高い安定性を示したことである。これは可視光照射によって著しい不可逆的変性がゲル-液晶相転移後の液晶相において誘発されるDMPCリポソームの場合とは全く対照的であった。部分フッ素化リン脂質F4-DMPCリポソーム中に再構成された膜タンパク質bRは、ゲル相・液晶相ともに天然膜中のbRに類似した構造・機能を有し、非常に安定な再構成を実現した。

第5章では、F4-DMPC膜中においてbRが液晶相で二次元結晶構造をとる要因に関して明らかにするため、第3章と第4章の結果を踏まえ、DMPC/F4-DMPC混合膜に着目した。第3章ではDMPCとF4-DMPCの混合膜中ではそれぞれの脂質が相分離を起こし、F4-DMPCは他の物質との親和性が低い特徴を示した。この相分離を起こす

DMPC/F4-DMPC 混合膜中で bR の挙動を解析することで、F4-DMPC リポソームに再構成した bR の三量体の形成に関する要因を探ることを目的とした。F4-DMPC と DMPC からなる二成分リポソームにおける 2 系列の bR 再構成実験を通して、部分的にフッ素化されたホスファチジルコリンと非フッ素化されたホスファチジルコリンとの間のリン脂質と膜タンパク質との親和性の顕著な差異があることがわかった。さらに、部分的にフッ素化されたリン脂質の膜タンパク質との親和性は、通常为非フッ素化リン脂質よりも低く、これは膜タンパク質の分子集合を促進すると考えられた。膜タンパク質とのリン脂質の分子相互作用における重要な変化は、疎水性アシル鎖の末端領域に Rf 基を導入することによって誘導され、部分フッ素化リン脂質および脂肪酸の膜特性は Rf 鎖長に大きく依存するため、膜タンパク質 - リン脂質相互作用がリン脂質のアシル鎖における Rf 鎖長に依存して制御され得ることを強く示唆している。

以上のように本研究では、フッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への応用を目的として、フッ素導入量を調節した部分フッ素化リン脂質の物性を評価した結果、部分フッ素化リン脂質膜は際立った性質を示すことを明らかにした。また部分フッ素化リン脂質膜への膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) の再構成を行い、その構造や機能を解析し、フッ素化リン脂質が膜タンパク質の再構成基材として有用性を示すことができた。これらの結果は、フッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への応用の第一歩として期待できるものである。

謝辞

本研究を遂行し、本論文を纏めるにあたり、多くの方々に大変お世話になりました。この場をお借りして、感謝の意を述べさせていただきます。

指導教員である園山正史教授には、終始懇切なご指導ご鞭撻を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、学部生の頃からご指導ご助言を頂きました群馬大学高橋浩教授に厚く御礼申し上げます。

本研究で使用した部分フッ素化リン脂質の試料の提供と、研究に対するご助言を頂きました産業技術総合研究所の高木俊之博士、馬場照彦博士、金森敏幸博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご指導ご助言を頂きました名古屋大学横山泰範博士、北海道大学菊川峰志博士、群馬大学網井秀樹教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで応援して支えて下さった家族の皆様に心より感謝いたします。

吉野賢