

# 脂質-膜タンパク質ドメインの制御によるナノプラントの構築

「組織化と機能」領域 出羽毅久

## 要旨

本研究では、二成分系脂質が形成する脂質ドメイン中に選択的に光合成系膜タンパク質（アンテナ系タンパク質/色素複合体）を組織化することを目的とする。組織化の戦略として、脂質-タンパク質間相互作用に注目し、アンテナ系膜タンパク質とドメインを形成する脂質分子との相互作用を増加させることを考案した。大腸菌発現系により、末端領域（膜界面領域）にシステインを有する光収斂系ポリペプチドを得た。また、脂質の極性部位にジスルフィド結合を有するものを諸種合成した。脂質二分子膜中でのアンテナ系膜タンパク質/色素集合体の形成能を検討した結果、集合体はジスルフィド化された流動性に富む脂質ドメインに選択的に配置化されていることが共鳴蛍光エネルギー移動法および全反射型蛍光顕微鏡観察により認められた。

## I. 研究のねらい

生体膜では、特定の脂質成分が動的平衡によりドメイン（マイクロ相分離構造）を形成し、そこで協同的に機能する複数のタンパク質群が動的に集積化されていると考えられている。ある機能（エネルギー生産や酵素反応など）に関連する一連の膜タンパク質群を脂質ドメイン上の"適材適所"に機能的に組織化することができれば、その作用機構の解明のみならず、高効率な多段階触媒反応系「ナノプラント」を構築しうる技術の芽となることが期待できる。しかし、膜タンパク質はその高い疎水性の為にランダムな自己会合体を形成しやすく、人工的に多成分の膜タンパク質を脂質膜中で組織化することは、現在の所、極めて困難である。本研究は、脂質が形成するドメインに着目し、特定の膜タンパク質を脂質ドメイン中に選択的に組織化を目標とする。そのためには、タンパク質間および脂質-タンパク質間相互作用を制御する必要があり、そのアプローチとして、脂質と膜タンパク質との可逆的な化学結合を形成させることにより、特定の脂質ドメイン中への膜タンパク質の組織化を行う。本研究では、膜タンパク質として自己会合性をもつアンテナ系タンパク質複合体を用い、脂質ドメイン選択的な組織化を検討した。

## II. 研究成果と考察

### 1. マルトース結合タンパク質(MBP)との融合ポリペプチドの脂質二分子膜中における自己組織化

本研究で用いた膜タンパク質（疎水性ポリペプチド）は、光合成細菌(*Rhodospirillum rubrum*)のアンテナ系複合体を形成する LH1 $\beta$ のアミノ酸配列をもとに設計した（図1）。この LH1 $\beta$ はオクチルグリコシド(OG)ミセル溶液中で光合成色素(Zn-BChl *a*)と結合し、二量体程度のサブユニット型複合体を形成する。このN末端領域を含まない synthetic LH1 $\beta$ ではサブユニット型がさらに集合した LH1 型複合体を形成することが認められている。この知見に基づき、C末端領域にシステインを有する疎水性ポリペプチド(1)を設計し、大腸菌発現系によりマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質(MBP-1)として得た。トリプシン処理により MBP 部位を切除した疎水性ポリペプチド 1 は、synthetic LH1 $\beta$ と同様に、OG ミセル系においてサブユニット型（室温）から LH1 型(4 °C)複合体を形成することが認められた。

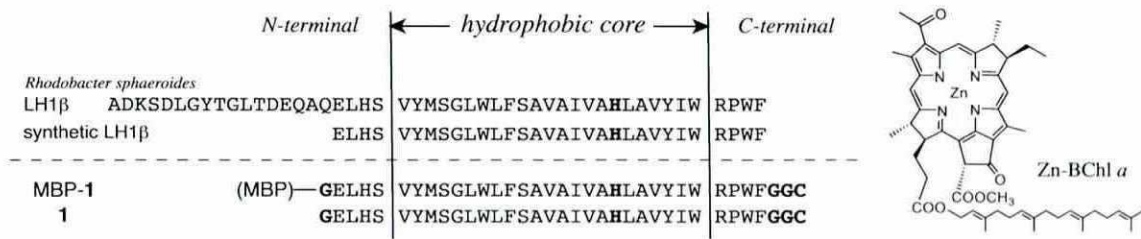


図1. 本研究で用いた疎水性ポリペプチドのアミノ酸配列および光合成色素

興味深い結果は、融合タンパク質(MBP-1)の状態でもサブユニット型複合体を形成することである。MBPは楕円球状の水溶性タンパク質で、その分子量(40 kDa)はポリペプチド1の約10倍である。C末端のシステインがジスルフィド化した二量体(MBP-1)<sub>2</sub>についても同様のサブユニット型複合体形成が観測された。この際、色素の吸収波長がMBP-1と比較し、6nm短波長シフトしていることから、C末端での架橋が色素の配向に影響を与えていることが考えられる。図2に示すように、OGミセル中で色素と複合体を形成させた(MBP-1)<sub>2</sub>とリン脂質(ジオレオイルホスファチジルグリセロール: DOPG)より、共ミセルを形成させ、透析操作により脂質二分子膜中に導入した。この状態でも色素の吸収波長はサブユニット型を示した。これをトリプシン処理することにより、MBP部位を切除することができた。MBP切除直後はサブユニット型複合体であったものが、4°C冷却下2日程度でLH1型の複合体へと変化することが確認できた。立体的に大きなMBP部位を残した状態で脂質二分子膜に導入し、さらに切除することにより自己集合させる本手法は、脂質二分子膜に対して膜タンパク質の方向性を制御しうる有効な手法である。

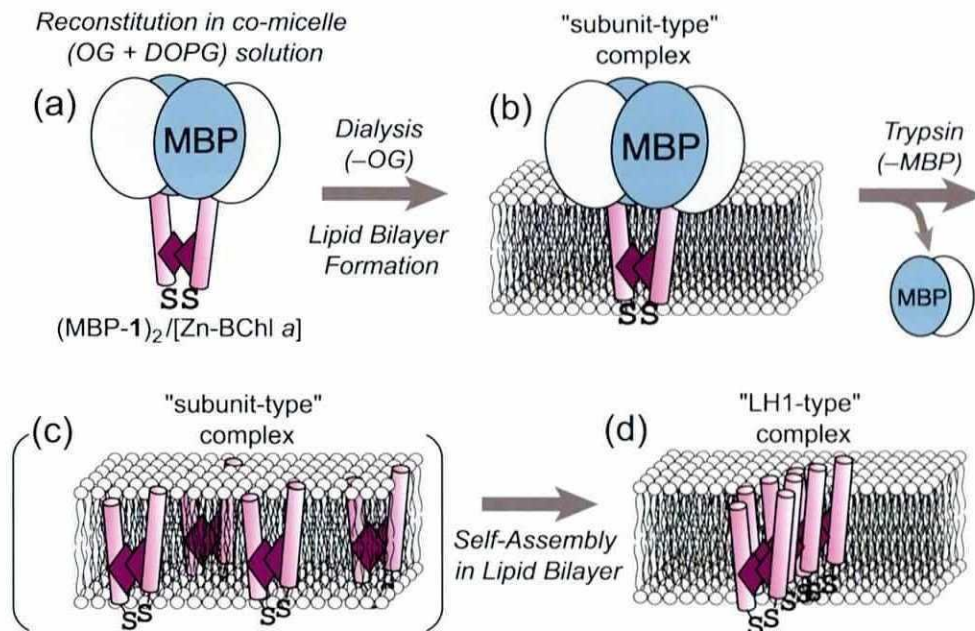


図2. 脂質二分子膜中でのタンパク質/色素複合体の自己組織化

## 2. 脂質ドメイン選択的なタンパク質/色素複合体形成

上述のポリペプチド1を用いて、諸種の脂質二分子膜中における色素との複合体形成能を調べたところ、脂質のアシル鎖がジオレオイル、極性部位がジスルフィド架橋されたもの(DO-DO)ではサブユニット型複合体を形成し、それよりも膜の流動性が下がるにつれてLH1型複合体を形

成することがわかった。また天然型のホスファチジルコリン(PC)類ではアシル鎖の種類に関わらずLH1型複合体を形成した。そこで、非相容系の二成分系脂質二分子膜(DO-DO/DSPC)において、蛍光ラベルしたリン脂質から Zn-BChl *a* への蛍光共鳴エネルギー移動法により、1/Zn-BChl *a* の複合体が配置されている脂質ドメインを調べた。蛍光プローブは極性部位にローダミンを有する *N*-Rh-DOPE あるいは *N*-Rh-DSPE を用い、DO-DO 相、DSPC 相にそれぞれ選択的に分配させた。ローダミンから Zn-BChl *a* へのエネルギー移動に関しては *N*-Rh-DOPE を用いた系においてより高いエネルギー移動効率が観測されたことから(図3)、1/Zn-BChl *a* の複合体は DO-DO ドメインに選択的に配置されていることがわかった。また、図4に示す全反射型蛍光顕微鏡観察において、1/Zn-BChl *a* の発光強度が不均一であることから確認された(白色部分が DO-DO ドメインに配置された 1/Zn-BChl *a* の複合体)。このようなジスルフィドを有する脂質ドメインに選択的な 1/Zn-BChl *a* の組織化は、図5に示すように、脂質とポリペプチド1間のジスルフィド架橋により DO-DO ドメインへの相容性が増加した結果であると考えられる。

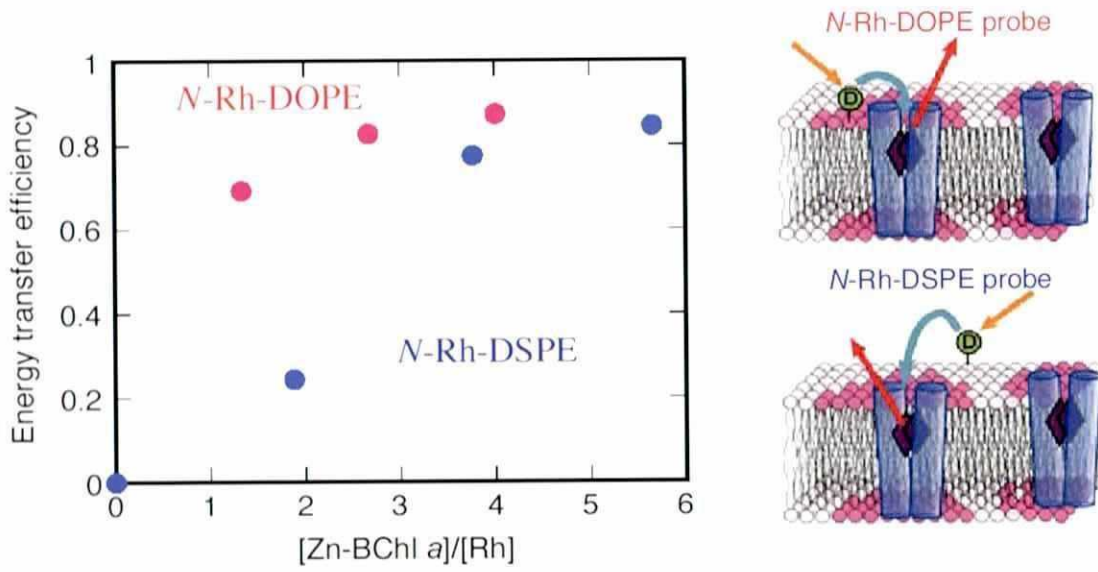


図3. 2つの脂質ドメインにラベルしたローダミンから Zn-BChl *a* への蛍光共鳴エネルギー移動効率

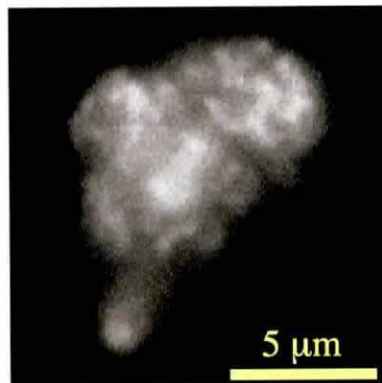


図4. ジスルフィド化リン脂質/DSPC 二成分系脂質二分子膜中に再構成したポリペプチド 1/Zn-BChl *a* 複合体の全反射型蛍光顕微鏡像

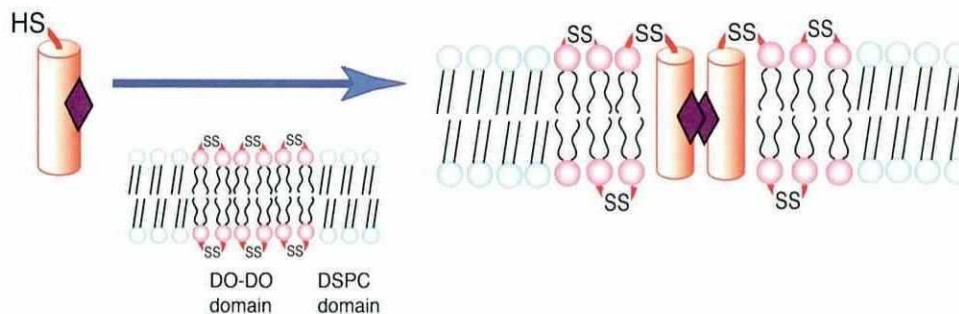


図5. ドメイン選択的なポリペプチド1/Zn-BChl a 複合体の模式図

### 3. アンテナ系タンパク質複合体(LH2)の脂質ドメイン選択的な組織化過程の観察

脂質ドメインへの膜タンパク質の組織化の観察方法として、ここではあらかじめカバーガラス上に脂質ドメインを形成させた後、膜タンパク質を配置させることを試みた。まず、アニオン性脂質からなる二成分系脂質二分子膜 (DOPG/DSPG) の巨大ベシクルを、カチオン化処理したカバーガラス上に展開することによりドメイン構造を有する平面膜を調製した。その後、アンテナ系タンパク質複合体(LH2)溶液を添加したところ、DOPG からなる液晶相に選択的に配置されることが見いだされた (図6)。図中の明るい部分はDOPG相、黒い部分はDSPG相である。



図6. 脂質ドメインに選択的に配置されたアンテナ系タンパク質複合体の全反射蛍光顕微鏡像。白い部分が液晶ドメイン中のタンパク質複合体。スケールバーは10 μm。

これは、より流動性の高い液晶相に対して膜タンパク質である LH2 がゲル相よりも高い親和性を有しているためであると考えられる。興味深いことに、このドメイン選択的な LH2 の配置は時間が経つと変化することがわかった。すなわち、液晶相に LH2 が配置された後、徐々にゲル相にも LH2 がドメインの形状を保ったまま分配されていく様子が観察された。機構の詳細についてはさらに検討の余地があるが、二分子膜上から導入された膜タンパク質が膜中への挿入とそれに引き続く側方拡散による再配置の過程を観察しうることを示している。このことは、人工的に膜タンパク質群を脂質二分子膜に組織化する際に重要な知見を与えることが期待できる。

#### 4. 脂質-タンパク質ハイブリッド化のための新規脂質反応中間体の開発

本研究においては、脂質とタンパク質間をジスルフィド結合により化学的に結合（ハイブリッド化）することにより分子間相互作用（脂質-タンパク質間、タンパク質-タンパク質間）を変化させた。ここではアミノ基との反応によるコンジュゲートが可能な新規な脂質分子を得ることに成功した。反応スキームを図7に示した。ジアルキルリン酸エステルと2-ブロモエタノールを縮合させようとしたところ、この反応は起こらず、代わりにジアルキルリン酸エステル(1)が二量化した酸無水物が高収率(~90%)で得られた。この酸無水物は諸種のアミン類と速やかに反応し、ホスホロアミダイト結合を形成することがわかった。この酸無水物中間体は、水分存在化でも比較的安定であるため、諸種のタンパク質のアミノ基との反応により、簡便にコンジュゲート化が可能であると期待できる。

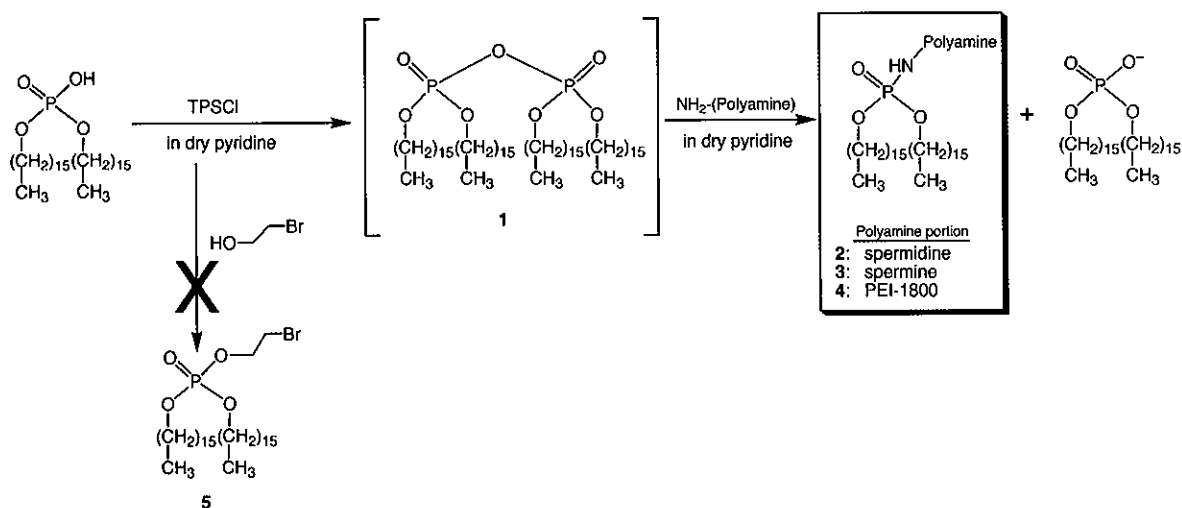


図7. アミノ基と反応する新規ジアルキルリン酸エステル無水物(1)

### III. 展開

最近の報告において、光合成膜でのタンパク質群の配置が不均一であることが示されたが (Bahatyrova, et al., *Nature* 430, 1058 (2004))、そのようなタンパク質群の配置の必然性や組織化の機構については未だ不明である。本研究において、ジスルフィド結合を有する脂質ドメインにアンテナ膜タンパク質を選択的に組織化する方法を確立することができた。この系を用いることにより、光反応中心複合体（膜タンパク質）をドメイン内（あるいは異なるドメイン）に組織化することが可能になると期待でき、さらには光合成膜でのタンパク質群の不均一な配置についての知見が得られると考えられる。また、光合成の初期過程（光収穫、電荷分離、電子移動、ATP合成）に関与するタンパク質はすべて膜タンパク質である。これらが協同的に機能するプロセスを本研究の成果で得られた手法を用いて、脂質二分子膜系での組織化することにより、機構解明および人工系（ナノプラント）としての発展が期待できる。現在、構造が明らかにされた膜タンパク質はほんの40~50例ほどであるが、今後ますますその数は増えるであろう。その際にも、本研究で得られた組織化の手法の有用性が発揮されると期待できる。

## 発表論文

- (1) Design and Expression of Cysteine(s)-bearing Hydrophobic Polypeptides and Their Self-Assembling Properties with Bacteriochlorophyll *a* Derivatives as a Mimic of Bacterial Photosynthetic Antenna Complexes. Effect of Steric Confinement and Orientation of the Polypeptides on the Pigment/Polypeptide Assembly Process  
T. Dewa, T. Yamada, M. Ogawa, M. Sugimoto, T. Mizuno, K. Yoshida, Y. Nakao, M. Kondo, K. Iida, K. Yamashita, T. Tanaka, and M. Nango, *Biochemistry*, *in press*
- (2) Novel Polyamine-Dialkyl Phosphate Conjugates for Gene Carriers. Facile Synthetic Route via an Unprecedented Dialkyl Phosphate, T. Dewa, Y. Ieda, K. Morita, L. Wang, R. C. MacDonald, K. Iida, K. Yamashita, N. Oku, M. Nango, *Bioconjugate Chem.*, **15** (2004), pp824-830.

## 著書

脂質膜中での光合成アンテナ系膜タンパク質複合体の組織化

出羽毅久・南後 守

「リボソーム応用の新展開 人工細胞の開発」エヌ・ティー・エス 印刷中