

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570165

研究課題名（和文）

表面増強赤外分光法を用いた膜タンパク質構造・機能解析システムの開発

研究課題名（英文）

Development of Analytical System of Structure and Function of Membrane Proteins with Surface-enhanced Infrared Spectroscopy

研究代表者

園山 正史 (SONOYAMA MASASHI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40242242

研究成果の概要（和文）： 膜タンパク質構造・機能解析システムの構築を目指し、短鎖リン脂質による可溶化、部分フッ素化リン脂質リポソームへの膜タンパク質再構成、表面増強赤外分光計測システムの構築の3つの基盤技術の検討・開発を行った。その結果、短鎖リン脂質は膜タンパク質の可溶化に有用であることが示唆された。また、部分フッ素化リン脂質により、膜タンパク質が天然類似の構造・機能を有する存在環境を実現できることを明らかにした。さらに金薄膜表面にタンパク質を固定した、表面増強効果を利用した計測システムを構築した。

研究成果の概要（英文）： Experimental techniques on membrane proteins for solubilizing with short-chain phospholipids, reconstituting into partially fluorinated phospholipid vesicles and on a sensitive infrared detection with surface-enhanced effects have been developed for constructing an analytical system of structure and function of membrane proteins. It has been demonstrated that short-chain phospholipids are powerful for solubilization of membrane proteins and that vesicles of partially fluorinated phospholipids are suitable materials for incorporating membrane proteins under native conditions. An analytical system with surface-enhanced infrared spectroscopy has been developed for membrane proteins research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生体分子科学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物物理学

キーワード：膜タンパク質、赤外分光、構造・機能解析、可溶化、界面活性剤、リン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

情報伝達、エネルギー生産等の生命活動上重要な機能の場である生体膜は、主として脂質、タンパク質からなる分子集合体である。生体膜における機能発現の主役である膜タンパク質は複雑な環境にさらされているため、実験的な研究が進展しているものは非常に限られている。近年のゲノム解析により、ほとんど全ての生物種で全 ORF の約 1/4 が膜タンパク質をコードしているのに対し、機能発現機構の理解に不可欠な立体構造のデータベース PDB における膜タンパク質の登録数が 1% に満たないことに、この状況は象徴的に表れている。しかしゲノム計画の進展と相まって、基礎・応用の両面から膜タンパク質研究の重要性はますます高まっており、構造・機能解析に向けて、*in vitro* 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。

一方近年、膜タンパク質の機能場である生体膜に関して、その構成分子が空間的、時間的に興味深い特徴的な分布を示す脂質膜ドメインの存在が注目されている。脂質膜ドメインは特定の脂質とタンパク質からなる分子集合体であり、生物物理学的にも興味深い対象となっている。天然の生体膜中に膜タンパク質を含む分子集合体として脂質膜ドメインが見出されたという事実は、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、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る。したがって、機能場である脂質二重膜との関係をふまえた、総合的な膜タンパク質研究の遂行が求められている。

## 2. 研究の目的

研究代表者たちは、脂質・タンパク質分子集合体である生体膜は膜タンパク質の機能場であることを強く意識し、脂質二重膜の組成・相挙動を踏まえた膜タンパク質の総合的研究を遂行している。これまでの研究をさらに発展させるために、本研究課題では、膜タンパク質の研究基盤として、安定した可溶化および再構成膜調製に関する技術をさらに発展させることを第 1 の目的とした。可溶化に用いる界面活性剤としては、天然生体膜中のリン脂質と同じ基本構造を持つ短鎖リン脂質に着目し、その特徴を詳細に調べた。一方再構成に用いるリン脂質には、一般のリン脂質二重膜の脆さを克服するために、新たに設計・合成した含フッ素リン脂質を用いた再構成を行い、非含フッ素リン脂質との比較から、その特徴を明らかにすることを試みた。さらにこれらの技術を利用して、生体膜近傍の情報を選択的に得ることが可能な表面増

強赤外分光法 (SEIRAS) を用いた、膜タンパク質構造・機能解析システムを構築することを目指した。

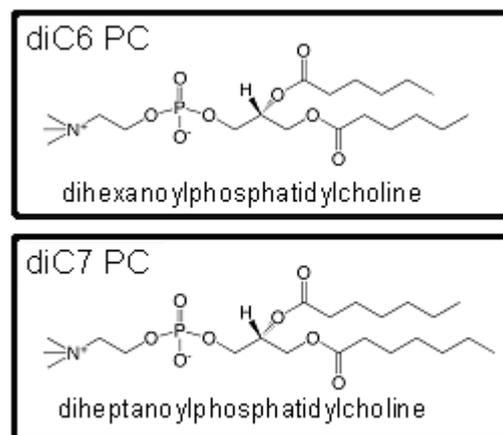
## 3. 研究の方法

本研究課題においては、主として 3 つの要素技術、つまり膜タンパク質の可溶化、再構成、表面増強赤外スペクトル計測システムを開発し、それらを統合することにより、膜タンパク質構造・機能解析システムの構築を目指した。

上記の目的を達するために、まず膜タンパク質可溶化に関して、2 種類の短鎖リン脂質 diheptanoylphosphatidylcholine (diC7PC) と dihexanoylphosphatidylcholine (diC6PC) を用いて膜タンパク質の可溶化挙動を調べた。高度好塩菌由来のバクテリオロドプシン (bR、*H. salinarum* 由来) とハロロドプシン (hR、*N. pharaonis* 由来) を、モデル膜タンパク質として用いた。bR および hR は既報に従い精製した。

界面活性剤濃度、可溶化温度・時間を変数として、bR あるいは hR を界面活性剤と混合後、超遠心後の上清と沈殿を可視吸収スペクトルにより定量することにより、可溶化挙動を詳細に調べた。また可溶化した膜タンパク質の安定性を、暗中小および可視光照射下における変性実験に基づき評価した。比較のため、一般的な界面活性剤オクチルグルコシド (OG) およびその類縁物質であるオクチルチオグルコシド (OTG) についても、同様な実験を行った。

含フッ素リン脂質を用いた膜タンパク質の再構成法の検討では、これまでに実験結果を蓄積してきた、通常の飽和アシル鎖を有するリン脂質と bR を用いた調製法に準じた。含フッ素リン脂質再構成試料における bR の構造・機能の特徴を、紫外可視吸収、円二色性、可視過渡吸収の 3 種類の分光法及び変性実験により調べた。



表面増強赤外計測システムの構築においては、循環式恒温水槽と接続可能なATR付属装置を用いて、Osawaらにより考案された無電解メッキ法によるATR用Si結晶表面への金薄膜作成条件の検討を行った。また赤外スペクトルにおける表面増強効果を、金薄膜状に調製した有機薄膜の吸光度から調べた。さらに、末端領域にフリーなCysを持つタンパク質を用いて、金薄膜へのタンパク質の固定を調べた。

#### 4. 研究成果

(1)短鎖リン脂質 diC7PC および diC6PC を用いて bR の可溶性挙動を詳細に調べた。diC7PC の場合、濃度 15 mM、4 °C・12 時間の可溶化条件が最適であることがわかった。この可溶化条件では、全く変性することなくほとんど全ての bR が可溶化されることがわかった。さらに、暗中（非機能時）および可視光照射下（機能時）における変性実験を行ったところ、一般的な界面活性剤オクチルグルコシドや Triton X-100 に比べて、著しく安定性が高いことが明らかになった。特に機能時の安定性が他の界面活性剤による可溶化試料では極めて低いのに対し、diC7PC を用いた場合は格段に安定性が高くなることが特徴的であった。一方 diC6PC では、およそ 4 割程度の可溶化率であった。

同様の実験を hR に対して行った結果、bR に比べるとやや低いものの、diC6PC、diC7PC のいずれの場合も、高い可溶化率と安定性を兼ね備えた可溶化が実現できることが明らかになり、短鎖リン脂質が膜タンパク質の可溶化に用いる界面活性剤として有効であることが示唆された。bR および hR は膜タンパク質の主要な基本構造である 7 本膜貫通ヘリックスを持つタイプであり、今後、他の膜タンパク質へも展開を図り、その有用性を調べる予定である。

一般的な非イオン性界面活性剤である OG の類縁物質である OTG による可溶化では、短鎖リン脂質に比べて、可溶化率は高いものの、安定性が若干低いことがわかった。

(2)構造・機能解析システム構築のための試料調製において、最も重要である可溶化した膜タンパク質の脂質二重膜への再構成法を検討した。本研究課題では、脂質二重膜に一定の強度を付与するために、脂質分子のアシル鎖の一部をフッ素化した新規部分フッ素化リン脂質を新たに合成し、その特徴を調べた。まず脂質二重膜としての物性を調べた結果、対応する非含フッ素リン脂質に比べてゲル-液晶転移温度は低下した。また、新規部分フッ素化リン脂質は、非フッ素化リン脂質に比べて、脂質二重膜としては固いが十分な流動性を示すことがわかった。

確立した適切な再構成条件の下、bR を再構成したところ、およそ 9 割の収率で再構成膜の調製を実現した。各種分光測定の結果から、再構成膜中の bR は、天然紫膜類似の機能サイクルをもち、液晶相においても三量体を形成していることが明らかになった。このことは、非部分フッ素化リン脂質に再構成した bR は、三量体がゲル-液晶転移により単量体へ変化することや天然紫膜とは異なる光サイクル中間体を示すことに対して、極めて対照的である。さらに、部分フッ素化リン脂質再構成 bR は、液晶相における光照射下の安定性が著しく高くなることが明らかになった。上記の部分フッ素化リン脂質再構成試料に見られる特徴は、フッ素原子導入による脂質二重膜の物性に由来するものか、bR 分子との親和性に因るものか、現在検討中である。

(3)SEIRAS 用セルの作成および SEIRAS 測定条件の検討を行った。循環式恒温水槽により温度制御可能となるように改良した ATR 付属装置を用いて、無電解メッキ法による ATR 用 Si 結晶表面への金薄膜作成法を最適化し、SEIRAS 用セルを作成した。この SEIRAS 用セルにおける表面増強効果を、有機薄膜を試料として検討した結果、少なくとも一桁程度の信号の増強を確認した。

次に、金薄膜へ試料を固定するための実験として、末端領域にフリーなシステイン残基を有するいくつかの水溶性タンパク質を用いて、固定化の挙動を調べた。その結果、金薄膜上に一定量の固定が示唆される結果が得られた。現在、それぞれの要素技術を統合することにより、膜タンパク質構造・機能解析システムの予備的なもの的高度化を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① A. Asada and M. Sonoyama (2011) Solubilization and structural stability of bacteriorhodopsin with a mild nonionic detergent n-octyl- $\beta$ -thioglucoiside, *Biosci. Biotech. Biochem.* 75, 376-378. 査読有
- ② Y. Yokoyama, L. Negishi, T. Kitoh, M. Sonoyama, Y. Asami and S. Mitaku (2010) Effect of lipid phase transition on molecular assembly and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted into phosphatidylcholine liposomes with different acyl-chain lengths, *J. Phys. Chem. B.* 114, 15706-15711. 査読有
- ③ M. Sonoyama, M. Fukumoto and Y. Kuwabara (2010) Highly stable

solubilization of membrane protein bacteriorhodopsin with a short chain phospholipid

diheptanoylphosphatidylcholine, Chem. Lett. 39, 876-877. 査読有

- ④ Y. Yokoyama, M. Sonoyama and S. Mitaku (2010) Structural changes of bacteriorhodopsin in purple membranes induced by irreversible photobleaching with heterogeneous and homogeneous stability, Photochem. Photobiol. 86, 297-301. 査読有
- ⑤ M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo and S. Mitaku (2009) Effect of molecular assembly on photocycle of reconstituted bacteriorhodopsin: Significant blue shift of the late M photointermediate in the liquid crystalline phase, Chem. Lett. 38, 1134-1135. 査読有

[学会発表] (計25件)

- ① 園山正史、吉野賢、高木俊之、高橋浩、馬場照彦、金森敏幸、新規部分フッ素化燐脂質の膜タンパク質研究への応用、第11回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2012.1.31、産業総合技術研究所つくばセンター共用講堂 (茨城県)
- ② M. Yoshino, T. Kikukawa, T. Takagi, Y. Yokoyama, H. Takahashi, T. Baba, T. Kanamori, M. Demura, and M. Sonoyama, Structure and Function of Bacteriorhodopsin Reconstituted into Partially Fluorinated Phosphatidylcholine Liposome、5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions、2012.1.7、東大寺総合文化センター (奈良県)
- ③ M. Yoshino, T. Kikukawa, T. Takagi, Y. Yokoyama, H. Takahashi, M. Demura, T. Baba, T. Kanamori and M. Sonoyama, A Comparative Study of Reconstituted Bacteriorhodopsin in Partially Fluorinated and Unfluorinated Phosphatidylcholine Liposome 1st International Conference on Element Innovation、2011.12.9、桐生市民会館 (群馬県)
- ④ Y. Kuwabara, M. Fukumoto, T. Kikukawa, M. Demura and M. Sonoyama, Decay Kinetics of the M Photointermediate of Bacteriorhodopsin in Short Chain Phosphatidylcholine Micelles、日本生物物理学会第49回年会、2011.9.16、兵庫県立大学書写キャンパス (兵庫県)
- ⑤ M. Yoshino, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, T. Takagi, H. Takahashi, M. Demura, T. Baba, T. Kanamori and M. Sonoyama, Reconstitution of Bacteriorhodopsin into Partially Fluorinated Phosphatidylcholine Liposomes、日本生物物理学会第49回年会、2011.9.16、兵庫県立大学書写キャンパス (兵庫県)
- ⑥ 上治瑛、吉野賢、高橋浩、高木俊之、馬場照彦、金森敏幸、園山正史、新規部分フッ素化リン脂質 1,2-Di(14,14,14,13,13,12,12,11,11-nonafluorotetradecanoil)-glycero-3-phosphorylcholine 二重膜の熱物性と膜の安定性、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011.9.13日、つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑦ M. Sonoyama, M. Fukumoto and Y. Kuwabara、Highly stable solubilization of membrane proteins with a short chain phospholipid、第83回日本生化学会大会、2010.12.9、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑧ M. Yoshino, H. Takahashi, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, M. Sonoyama, Structure and thermal properties of binary lipid bilayers of partially fluorinated and normal phosphatidylcholine、日本生物物理学会第48回年会、2010.9.22、東北大学川内北キャンパス (宮城県)
- ⑨ T. Kito, Y. Yokoyama, R. Negishi, M. Sonoyama and S. Mitaku, Effect of molecular assembly upon structure and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted into phosphatidylcholine lipid liposomes、日本生物物理学会第48回年会、2010.9.22、東北大学川内北キャンパス (宮城県)
- ⑩ M. Fukumoto, Y. Kuwabara, T. Kikukawa, M. Demura and M. Sonoyama, Structural stability and photocycle of bacteriorhodopsin in short chain phospholipid micelles、日本生物物理学会第48回年会、2010.9.20、東北大学川内北キャンパス (宮城県)
- ⑪ 鬼頭琢・横山泰範・根岸瑠美・麻見安雄・園山正史・美宅成樹、アシル鎖長の異なる3種類の脂質膜リポソームに再構成されたバクテリオロドプシンにおける分子集合状態ならびに構造安定性に対する脂質膜相転移の影響、第10回日本蛋白質科学会年会、2010.6.17、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑫ 福元美奈・桑原由美子・園山正史、短鎖リン脂質ジヘプタノイルホスファチジルコリンによる膜タンパク質バクテリ

オロドプシンの可溶化、第10回日本蛋白質科学会年会、2010.6.17、札幌コンベンションセンター（北海道）

- ⑬ 園山正史・福元美奈・桑原由美子・菊川峰志・出村誠、短鎖リン脂質により可溶化したバクテリオロドプシンの構造安定性、日本化学会第90春季年会、2009.3.26、近畿大学（大阪府）
- ⑭ T. Kitoh, L. Negishi, Y. Yokoyama, M. Sonoyama and S. Mitaku、Photobleaching of bacteriorhodopsin reconstituted in DMPC and DPPC bilayer、日本生物物理学会第47回年会、2009.11.1、アスティー徳島（徳島県）
- ⑮ 鬼頭琢・根岸瑠美・横山泰範・園山正史・美宅成樹、脂質二重膜に再構成されたバクテリオロドプシンの脂質膜相転移への影響、第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22、熊本全日空ホテルニュースカイ（熊本県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem-bio.gunma-u.ac.jp/~biomolsci/public.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園山 正史 (SONOYAMA MASASHI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40242242