

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570153  
 研究課題名（和文） 膜タンパク質の構造形成・機能発現における脂質・タンパク質相互作用の役割  
 研究課題名（英文） Effect of lipid-protein interaction on structure and function of a membrane protein, bacteriorhodopsin  
 研究代表者  
 園山 正史 (SONOYAMA Masashi)  
 名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：40242242

## 研究成果の概要：

膜タンパク質の機能場である生体膜の総合的な理解を目指し、バクテリオロドプシンを合成脂質膜へ再構成した試料を用いて、脂質膜の構造・物性がバクテリオロドプシンの構造形成・機能発現に及ぼす影響を、分光学的な方法を中心に用いて調べた。その結果、脂質膜の相挙動がタンパク質のいくつかの階層構造に大きく影響を与えること、機能発現上きわめて重要な中間体に大きく影響を及ぼすこと等を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野： 生体分子科学、タンパク質科学、生物物理化学

科研費の分科・細目： 生物科学・生物物理学

キーワード： 膜タンパク質、脂質、脂質・タンパク質相互作用、構造形成、機能発現、過渡吸収、光受容タンパク質、プロトンポンプ

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析結果から、ほとんど全ての生物種において全 ORF の 2 割から 3 割が膜タンパク質をコードしていると考えられており、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いる。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、今後、次々と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。

一方、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、細胞生物学等の諸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という実験事実は、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、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はほとんどわかっていない。

私たちは、これまでの膜タンパク質バクテリオロドプシンの構造・機能・物性に関する研究の中で、天然状態、完全変性状態のいずれでもない中間的な状態を、天然紫膜の高温状態、界面活性剤による可溶化状態、DMPC等の飽和リン脂質二重膜への再構成状態等の条件で見出し、このいわば「非天然構造」に関する研究を機能発現能との関連から詳細に行ってきた。その結果、膜タンパク質の分子構造や集合状態の違いに加えて、脂質二重膜や混合ミセルといった、膜タンパク質の機能場の環境が、構造および機能発現に大きく影響している実験結果が得られてきた。特に脂質分子の有無、脂質分子の組成・相挙動が大きく影響していることが強く示唆される予備的実験結果が得られた。これらのことは、膜タンパク質に関する研究を、機能場である脂質二重膜との関係をふまえた上で総合的に進めることの重要性を強く示している。

## 2. 研究の目的

ゲノム情報を利用した膜タンパク質の遺伝子発現系が今後構築されていくことを視野に入れ、様々な脂質組成・相挙動の *in vitro* 膜タンパク質再構成系を構築する。この再構成系を用いて、機能場としての脂質二重膜における膜タンパク質の構造・機能・物性における脂質・膜タンパク質相互作用の役割を総合的に調べることを主たる目的とする。そして再構成した膜タンパク質をプローブとして、脂質膜の相挙動が膜タンパク質に及ぼす特徴を探る。この目的のため、天然状態の研究が進んでいる膜タンパク質であるバクテリオロドプシン (bR) を研究対象として用い、数種類のリン脂質二重膜へ bR を再構成し、構造・機能・物性を多面的、総合的に調べる。特に、膜タンパク質のフォールディングと機能発現の2つのポイントに力点を置く。前者については、天然紫膜中の bR との構造の類似点、相違点を明らかにし、脂質・タンパク質相互作用の視点から、膜タンパク質の構造形成に対する脂質二重膜の影響を明らかにする。後者については、私たちが見出した、本来機能発現のトリガーである可視光照射がもたらす光退色に関する研究を発展させるため、機能中間体におよぼす脂質膜の組成・相挙動の影響を、主として分光学的な方法により明らかにする。特に機能中

間体の寿命を詳細に調べるために、新たに分光器を導入し、可視領域の過渡吸収測定システムを構築する。

## 3. 研究の方法

実験に用いる膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) は、標準的な精製方法を用いて、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* から天然紫膜として得た。bR の再構成に用いた合成脂質は、主として DMPC<sup>1</sup> および DPPC<sup>2</sup> の2種類の中性リン脂質である。適切な再構成試料を得るための条件検討は、可溶化の温度、時間、界面活性剤の除去条件等を中心に行った。最終的に採用した再構成手順の概要は、以下の通りである。合成脂質への bR の再構成は、界面活性剤 Triton X-100 を用いて紫膜中の bR を可溶化し、脂質膜リポソームと混合後、バイオビーズで界面活性剤を除去することにより行った。

再構成 bR の高次構造は、遠紫外、近紫外、可視領域の円二色性により調べた。また、光機能中間体の寿命を調べるために、本研究課題において、可視領域の過渡吸収測定システムを構築し、再構成 bR の光サイクルを調べた。また、赤外分光法を用いて、タンパク質の二次構造変化を検討した。

## 4. 研究成果

安定な可溶化が実現可能であることを以前の研究で明らかにした穏やかな非イオン性界面活性剤 Triton X-100 を用いた、合成脂質膜リポソームへのバクテリオロドプシン (bR) 再構成法を、いくつかの脂質組成からなる脂質膜リポソームを対象に検討した。その結果、界面活性剤の除去にバイオビーズを用いることにより、迅速で安定な bR 再構成が可能であることがわかった。

本研究課題における研究項目の1つである、脂質組成の違いが bR の機能中間体の寿命におよぼす影響を調べるため、当初予定していた赤外領域の時間分解測定システムに加えて、新規導入した分光器と既存設備のレーザー等からなる可視領域のマイクロ秒過渡吸収測定システムを新たに構築した。この測定システムを用いて、DMPC からなる脂質膜リポソームに再構成した bR の機能中間体の寿命を、5°C (ゲル相) と 35°C (液晶相) で調べたところ、天然紫膜に比べて、ゲル相ではいくつかの中間体、特に M 以降の中間体において減衰が遅くなることがわかった。一方液晶相では、天然紫膜に類似したタイムスケールの光サイクルを示した。また、同じ吸収極大波長を持つが、異なる寿命を持つ2つの分子種が続いて生じる M 中間体においては、より遅い分子種の吸収極大波長が、天然

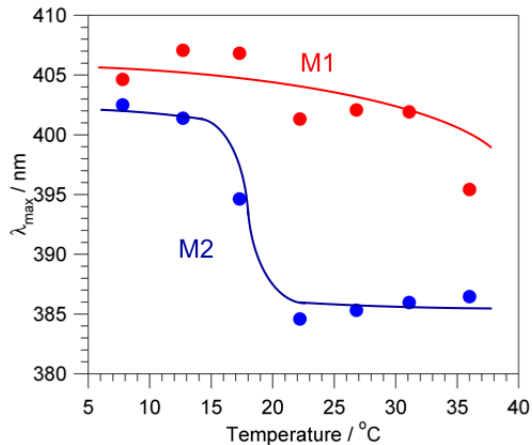


図 1. M 中間体の吸収極大の温度変化

紫膜に比べて 10nm 以上の大きなブルーシフトを示し、発色団レチナールとアポタンパク質の相互作用が弱くなっていることが示唆された。

そこで、さらに詳細な温度変化の実験を行い、M 中間体の挙動を詳しく解析した。その結果、図 1 に示すように、およそ 10-20°C の温度領域において、脂質二重膜のゲル-液晶転移に伴う M2 中間体の著しい短波長シフトが見られた。一方、M1 中間体では、温度変化に伴うゆるやかでわずかな短波長シフトが起きることがわかった。M2 中間体の短波長シフトが見られる温度領域は、DMPC のみからなる脂質膜のゲル-液晶転移に比較して、ブロードで低温側に若干シフトしているが、示差走査熱量計による結果によく一致している。また、再構成試料における bR 分子の集合状態を、可視領域の円二色性を用いて調べた。集合状態の変化に敏感な 600nm の CD は、M2 中間体の短波長シフトが見られる温度にほぼ一致した温度領域で、大きな変化を示した (図 2)。この変化は、再構成膜のゲル-液晶転移により、bR 分子の三量体構造が単量体に崩壊することを意味していると考えられる。

M2 中間体はプロトンポンプにおけるプロトンの放出と取り込みのスイッチングに関わる重要な中間体である。上記の実験結果から、脂質膜の相挙動が膜タンパク質の集合状態、さらにプロトンポンプ機能の発現に大きく影響を与えることが明らかになった。また、M2 中間体の著しい短波長シフトはレチナールポケット近傍の大きな環境変化を示しており、さらに高温で観測される光退色現象との関連性が示唆される。炭化水素鎖の長さの異なる脂質および不飽和炭化水素鎖を持つ脂質を使った実験をさらに行い、光退色現象の観点からも詳細な解析を行っている。現在のところ、脂質膜の相転移と bR 分子の集合

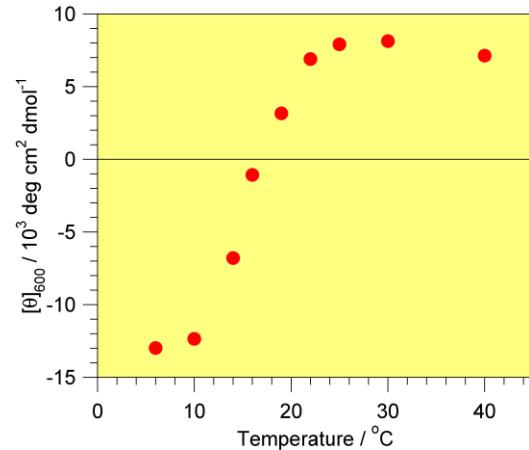


図 2. DMPC へ再構成した bR における 600nm の円二色性温度変化

状態、安定性に関する総合的な考察を進めている。

さらに、短鎖リン脂質と長鎖リン脂質からなる混合脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンについて、分光学的な方法を中心に検討を行った。その結果、円二色性スペクトルから、タンパク質の集合状態が単一の長鎖リン脂質再構成系とは異なることを示す実験結果が得られた。機能中間体の挙動については通常の再構成試料との間に顕著な違いが見られなかった。さらに詳細な実験を進めている。

また機能中間体の構造変化を調べるために、時間分解赤外スペクトルの測定システムの構築を進め、実験データの蓄積を進める一方、最終的な最適化を行っている。

<sup>1</sup> DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine

<sup>2</sup> DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Motonari Shibakami, Hisayoshi Tsuihiji, Shin Miyoshi, Makoto Nakamura, Shigeki Mitaku and Masashi Sonoyama, Reconstitution of bacteriorhodopsin into cyclic lipid vesicles, *Biosci. Biotech. Biochem.* 72, 1623-1625 (2008)、査読有り  
[http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/72/6/72\\_1623/](http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/72/6/72_1623/)
- ② Yasunori Yokoyama, Masashi Sonoyama, Tatsuhiko Nakano and Shigeki Mitaku, Structural change of bacteriorhodopsin in the purple membrane above pH 10 decreases

heterogeneity of the irreversible photobleaching components, J. Biochem. (Tokyo), 142, 325-333 (2007)、査読有り  
<http://jb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/142/3/325>

〔学会発表〕(計 12件)

- ① 東陽介、尾崎聡、渡邊直哉、横山泰範、園山正史、美宅成樹、バクテリオロドプシンのアルカリ化に伴う二次元結晶構造の崩壊過程、第9回日本蛋白質科学会年会、平成21年5月22日、熊本(予定)
- ② 成重太助、横山泰範、園山正史、美宅成樹、紫膜バクテリオロドプシンの光退色現象におけるタンパク質-脂質間相互作用の影響、第9回日本蛋白質科学会年会、平成21年5月21日、熊本(予定)
- ③ 鬼頭、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、平成21年5月21日、熊本(予定)
- ④ Masashi Sonoyama, Takashi Kikukawa, Yasunori Yokoyama, Shigeki Mitaku, Significant blue shift of the late M intermediate of bacteriorhodopsin reconstituted into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles in the liquid crystalline phase, 6th Asian Biophysics Association Symposium and 27th Hong Kong Society of Neuroscience Annual Meeting, January 11-15 2009, Hong Kong
- ⑤ 横山泰範、園山正史、美宅成樹、紫膜中のバクテリオロドプシンの光退色による構造変化、日本生物物理学会第46回年会、平成20年12月5日、福岡
- ⑥ 成重太助、横山泰範、園山正史、美宅成樹、脱脂質した紫膜の高温下における光退色現象に対する影響、日本生物物理学会第46回年会、平成20年12月5日、福岡
- ⑦ Masashi Sonoyama, Takashi Kikukawa, Yasunori Yokoyama, Makoto Demura, Naoki Kamo and Shigeki Mitaku, Effect of Molecular Assembly on Photocycle of Bacteriorhodopsin Reconstituted into Dimyristolyphosphatidylcholine Vesicles, 13th International Conference on Retinal Proteins, June 26-29 2008, Barcelona, Spain
- ⑧ Yasunori Yokoyama, Masashi Sonoyama and Shigeki Mitaku, Structural Changes of Bacteriorhodopsin in Purple Membrane Induced by Irreversible Photobleaching, 13th International Conference on Retinal Proteins, June 26-29 2008, Barcelona, Spain
- ⑨ 園山正史、菊川峰志、横山泰範、美宅成樹、合成脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンの光機能中間体に対する脂質膜相挙動の影響、第8回日本蛋白質科学会年会、平成20年6月12日、東京
- ⑩ 園山正史、菊川峰志、横山泰範、美宅成樹、合成脂質膜に再構成したバクテリオロドプシンの光サイクルに対する分子集合状態の影響、日本生物物理学会第45回年会、平成19年12月21日、横浜
- ⑪ 小糸直樹、杉山浩之、園山正史、美宅成樹、バクテリオロドプシン再生反応に対するイオン濃度及び温度の影響、日本生物物理学会第45回年会、平成19年12月21日、横浜
- ⑫ 横山泰範、園山正史、美宅成樹、中性pH条件下における光退色が引き起こす紫膜中のバクテリオロドプシンの構造変化、日本生物物理学会第45回年会、平成19年12月21日、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園山 正史 (SONOYAMA Masashi)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40242242