

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410003

研究課題名(和文) 膜タンパク質の結晶化を想定した脂質/水/光機能性界面活性材系の光誘起相転移制御

研究課題名(英文) Photoinduced phase transition of lipid / water / photo-functional surfactant system to obtain membrane protein crystals.

研究代表者

奥津 哲夫 (OKUTSU, TETSUO)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：20261860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：光化学反応により脂質の相転移を引き起こし、膜タンパク質の結晶化を開始させる研究を行った。本研究では光化学反応で構造変化する光機能性界面活性剤を用い、相転移する空間を限定しその場で結晶成長させることを検討した。光機能性界面活性剤としてAZTMAを合成した。その結果、AZTMAのtrans-cis異性化反応で脂質の相が立方相からラメラ相へ相転移することをX線回折実験により確認した。膜タンパク質としてバクテリオロドプシンを用い結晶化実験を行った。膜タンパク質分子の存在が相転移を引き起こす駆動力として働き、光誘起相転移で結晶化を誘起させる実験が困難なことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We studied photochemically induced phase transition of lipid to obtain membrane protein crystal. Crystallization of membrane proteins is mainly performed by using lipid phase transition as a driving force. In this study, we investigated phase transition of lipid with the use of a photochemical surfactant whose structure is changed by trans-cis isomerization. AZTMA having an azobenzene group was prepared as a photofunctional surfactant. As a result, it was confirmed that the phase transition of lipid phase from cubic phase to lamellar phase induced by trans-cis isomerization reaction of AZTMA by polarization microscopy and X-ray diffraction experiment. Crystallization experiments were carried out using bacteriorhodopsin as a membrane protein. The presence of the membrane protein molecule acted as a driving force causing a phase transition, and crystallization did not observed at the photo phase transition.

研究分野：物理化学

キーワード：結晶成長 タンパク質 光誘起結晶化 膜タンパク質 光誘起相転移

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造をX線結晶構造解析で行うためにはタンパク質の結晶を育成することが必要である。近年結晶育成の技術が発展している。タンパク質の結晶育成は構造生物学の研究者の経験の蓄積のみならず、物理化学の立場からも基礎的検討が行われてきた。例えば光の摂動を用いて、結晶核形成を誘起する研究がアメリカのシカゴのグループや大阪大学のグループを中心に進められ、実用化も進んでいる。このような背景の中で、我々はタンパク質の光化学反応により結晶化が誘起される現象を見だし、機構の解明を経て実用化への展開を進めてきた(日本結晶成長学会誌 38, (3), 2011)。また、我々の研究成果は JAXA のプロジェクトで宇宙における結晶育成実験にも参画が予定されている。しかしながら、これらの研究成果は水溶性タンパク質に対し効果的な機構であり、膜タンパク質の結晶化に関する研究は進んでいない。

2. 研究の目的

膜タンパク質は水に溶けないため、結晶化のためには、膜タンパク質を界面活性剤を用いて可溶化し、水溶性タンパク質として扱い、塩析により凝集力を得て結晶化する、という一連の工程が必要である。これらの複雑な操作のため結晶化が困難である。解決策として、膜タンパク質を水溶液中で扱わず、本来あるべき環境に近い脂質の中で結晶化

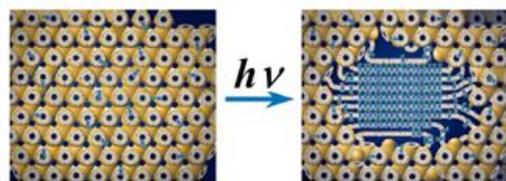


図1 (左) 脂質立方相に取り込まれた膜タンパク。脂質の立方相(スポンジ 左)から液晶相(ラメラ 右)に相転移すると膜タンパクは液晶相で二次元結晶を作る。これが上下の階層の膜タンパクと相互作用し、三次元結晶へと成長する。本研究では光機能性界面活性剤を用い相転移の起こる場所を空間限定し、媒質中の一ヶ所だけで相転移させ、そこに分子を濃縮し大きな結晶を育成することを目的とする。

する方法が提案されている。図1に脂質の中で行われる結晶化の概念を示す(「生体膜のダイナミクス シリーズ・ニューバイオフィジックス 4巻 日本生物物理学会編」)。脂質は水と混合して、結晶相、スポンジ相、液晶相(ラメラ相)をとる。タンパク質を脂質に取り込ませ、立方相(左)から液晶相(右)へ相転移を起こすと、タンパク質は液晶相中で二次元結晶を形成する。この二次元結晶が上下の階層の液晶中のタンパク質と相互作用し三次元結晶へ成長する。脂質を相転移させる方法は、塩を添加し脱水する。この方法により結晶化に成功し、構造が解明された新規タンパク質が増え続けている。本研究の目的は脂質の中で光化学反応を摂動として用い、相転移を誘起させ、限定された小さな空間のラメラ相で膜タンパク質の結晶化を行い、大きな結晶を得るものである。膜タンパク質の結晶育成の新たな方法論を構築する。

図2にフォトクロミック化合物を用いた光機能性界面活性剤の添加による光誘起相転移の概念を示す。脂質として水和モノオレインを用いる。モノオレインは水和量および温度に応じて立方相(Pm3m や Ia3d)やラメラ液晶相(L)をとる。相転移は、添加物を加えても起こる。添加する分子の形や量に依存して相境界が移動する。本研究では、添加物として光異性化反応により分子の形が変わる光機能性界面活性剤を加え相転移を誘起する。界面活性剤の疎水鎖の途中にアゾベンゼンを挿入し、シス-トランス光異性化により充填パラメーターを変化させる。本研究では AZTMA (図2) を試しに用いて検討することから始める。以下に本研究で具体

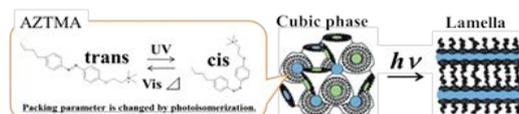


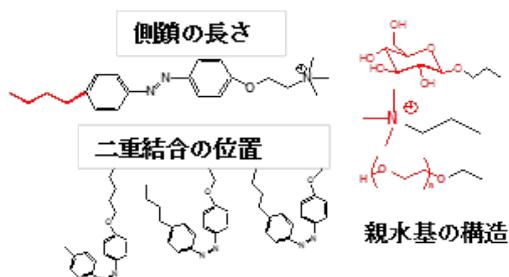
図2 脂質(モノオレイン)/水が形成する立方相の中に、添加物として光機能性界面活性剤(AZTMA)を加える。光化学反応によりアゾベンゼンの異性化反応がおこると、充填パラメーターが変化し、脂質の相の相転移が誘起され、タンパクを結晶化させる。この制御には、脂質の検出、光機能性界面活性剤の検出、タンパクの取り込み性や、タンパクの拡散のしやすさ、結晶化のしやすさなどを検討する。

的に達成すべき目的を説明する。

3. 研究の方法

(1) 構造変化によるアプローチ

本研究では光機能性界面活性剤としてアゾベンゼンの光異性化反応を起こす AZTMA を用いて実験を開始する。下図に示すアゾベンゼンの鎖中の位置、鎖の長さ、親水基の種類を検討し、類似化合物を合成し、相転移に関



わるパラメーターとして重要な因子を明らかにしてゆく。

(2) 膜タンパク質を用いた系で再現性よく定量的に議論ができる実験方法の構築。膜タンパク質をこの方法で光誘起相転移により結晶化させる実験を行う。実際に結晶化に用いられている実験方法は発展途上にある。一般に用いられている実験は結晶を出すことが目的であり、再現性が悪い。結晶育成中に複数の因子が同時に変化し、何が意味のあるパラメーターであったのか不明なことが多く、結晶が出た/出ないという定性的な結果となりがちである。現在行われている方法では、脂質/水系における水の含量が実験条件(気温・湿度など)により変化するため、再現性が得られない。そこで本研究では、定性的な評価に耐えうる実験方法の構築から始め、膜タンパク質の結晶化実験に取り組む。これにより、光の有/無だけで結果が左右される実験となるよう改良を進める。具体的には、水の含量が実験中に変化しないようにガラス細管の中ですべての実験が行われ、評価される方法を構築する。そして、結晶育成～X線結晶構造解析まで一つのサンプル管で済ます方法を構築する。

(3) モデル系を用いた膜タンパク質/脂質/水 + 光結晶化実験を行う。モデルタンパク質としてバクテリオロドプシン、脂質にモノオレイン、光機能性界面活性剤に AZTMA を用い実験を行う。

4. 研究成果

(1) AZTMA の光異性化による相転移

光機能性界面活性剤として AZTMA を合成した。この分子はアゾベンゼン骨格を含む界面活性剤で、アゾベンゼン骨格が trans-cis 光異性化反応を起こす。この分子をモノオレイ



図3 キャピラリーの中の脂質の右半分は紫外光を照射したときの偏光顕微鏡写真。立方相は光は透過しないが相転移してラメラになると光が透過する。

ン/水系に加え、光異性化反応により相転移が起こるか確認した。図3はキャピラリーに封じた立方相の脂質/水試料の右側半分に紫外光を照射した後の偏光顕微鏡写真である。立方相はクロスニコル条件で光を透過させないが、相転移してラメラになると光が透過する。この実験結果から光誘起相転移が確認された。さらに、低角X線散乱実験を行った。図4に光照射前と照射後の小角X線散乱の結果を示す。最初は立方相の散乱ピークの列のみが観測されていたが、照射後はラメラのピークが出現した。このことから立方相からラメラ相への光誘起相転移を確認した。

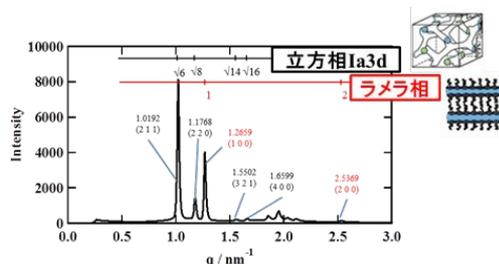


図4 低角X線散乱測定結果。光照射前は立方相La3dの散乱のみが観測されるが、光照射後はラメラのピークも出現した。

(2) 光誘起相転移による結晶化実験

膜タンパク質としてバクテリオロドプシンを用い結晶化実験を行った。実験結果を図5に示す。左は光照射を行わなかった試料、右は光照射を行った試料である。光照

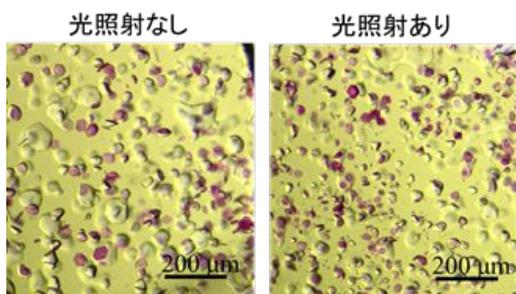


図5 光相転移によるバクテリオロドプシンの結晶化実験結果。光照射を行った試料(右)の方が結晶が多く小さく出現しているように見えるが、この実験方法では光による相転移以外の効果があるため、判断はできない。

射を行った試料では結晶が多くかつ小さく出現しているので、光で結晶化が促進された印象がある。この実験はLCPサンドウィッチプレートを用いて行ったものである。この方法では脂質に含まれる水が蒸発し、塩が濃縮されて相転移が誘起される。本研究では光の効果のみで相転移を起こし、そこで結晶が成長するかを議論するものであるから、LCPプレートを用いて実験を行うことは適切でない。そのためキャピラリーに脂質を封入し水の蒸発が起こらないようにし、光のみの効果で結晶成長するか確認する実験方法を構築した。

バクテリオロドプシンを脂質に加えX線散乱測定を行った。その結果、バクテリオロドプシンを加えないときは立方相を形成する条件でも、脂質に対して8モル%以上バクテリオロドプシンを加えるとラメラ相に相転移することが判明した。文献で結晶化が成功しているバクテリオロドプシン濃度は16モル%であるので、この条件では立方相 ラメラ相への変化を光で起こせな

【小角X線散乱の測定】

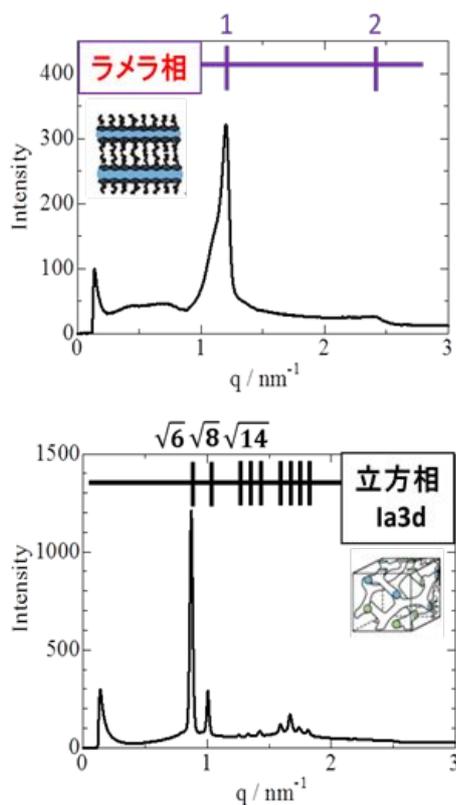


図6 (上)バクテリオロドプシンを8モル%加えた時の低角X線散乱。光を当てなくてもラメラのピークしか存在しない。(下)バクテリオロドプシンが4モル%の低角X散乱。立方相を示す。

い、かつ結晶化のためには濃度が不足する。バクテリオロドプシンの濃度を下げて立方相を形成させ、AZTMAの光異性化反応で相転移が起こる条件にするためには、バクテリオロドプシン濃度を4%にする必要があった。この条件で塩を用いず光誘起結晶化実験を行った。

その結果、光相転移は確認されラメラ相が出現した。しかし、ラメラ相にバクテリオロドプシンの結晶は出現しなかった。

バクテリオロドプシン濃度を低めたこと、塩を用いなかったことが結晶の出現しない理由と考え、塩が存在する条件で結晶化実験を行った。塩濃度、タンパク質濃度をいくつか試したが、タンパク質は結晶化しなかった。

バクテリオドブシンはモノオレインに比べて大きな分子である。立方相の脂質にバクテリオドブシンを加えると、バクテリオドブシンが存在することでラメラに変化してしまう。モノオレインとほぼ同じ長さで構造変化して曲がる分子としてAZTMAを用いると相転移した。しかし、AZTMAの構造変化で相転移を制御しても、バクテリオドブシンが存在することの効果大きいことが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

M. Utsumi, H. Horiuchi, T. Okutsu, Photo sensitization reaction-induced crystallization of lysozyme, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 344, 223-227(2017). [査読有]

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.05.027>

H. Horiuchi, A. Sakai, S. Akiyama, R. Ikeda, S. Ito, M. Furuya, Y. Gomibuchi, M. Ichikawa, T. Yoshihara, S. Tobita, T. Okutsu, Extension of π -system of silylated porphyrin derivative for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 339, 19-24(2017). [査読有]

doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.02.015

T. Okutsu, T. Taguchi, J. Korenaga, T. Kuroiwa, Y. Ishikawa, S. Iizuka, K. Sugiyama, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Investigation of the mechanism of photochemically-induced lysozyme crystallization, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 321, 180-186 (2016). [査読有]

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.01.026>.

H. Horiuchi, K. Terashima, A. Sakai, D. Suda, T. Yoshihara, A. Kobayashi, S. Tobita, T. Okutsu, The effect of central metal on the

photodynamic properties of silylated tetraphenylporphyrin derivative, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 321, 72-78(2016). [査読有]

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.01.004>

奥津哲夫, 光化学反応により誘起されるタンパク質の結晶成長, *レーザー研究* 43, 694-697(2015) [査読有]

http://www.lsj.or.jp/laser/11_2.html#N.

Hasebe, Y. Deguchi, S. Murayama, T. Yoshihara, H. Horiuchi, T. Okutsu, S. Tobita, Phosphorescence quenching of neutral and cationic iridium(III) complexes by molecular oxygen and aromatic electron acceptors, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 324, 134-144(2016). [査読有]

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.03.008>

H. Horiuchi, R. Kuribara, A. Hirabara, T. Okutsu, pH-Response Optimization of Amino-Substituted Tetraphenylporphyrin Derivatives as pH-Activatable Photosensitizers, *The Journal of Physical Chemistry*, 120, 5554-5561(2016). [査読有] DOI: 10.1021/acs.jpca.6b05019

N. Hasebe, K. Suzuki, H. Horiuchi, H. Suzuki, T. Yoshihara, T. Okutsu, S. Tobita, Absolute Phosphorescence Quantum Yields of Singlet Molecular Oxygen in Solution Determined Using an Integrating Sphere Instrument, *Anal. Chem.* 87, 2360-2366(2015). [査読有] DOI: 0.1021/ac5042268

H. Horiuchi, T. Kano, H. Uehara, T. Okutsu, Sono-activatable photosensitizer for photodynamic therapy, *Chem. Lett.* 43, 1423-1425(2014). [査読有] DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.140403>

S. Kyushin, Y. Saito, K. Yoshimura, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Synthesis and Properties of 5,10,15,20-Tetrakis(4-trimethylsilylphenyl)chlorin, *Heteroat. Chem.*,

25, 514-517 (2014). [査読有] DOI:
10.1002/hc.21232

H. Horiuchi, M. Hosaka, H. Mashio,
M. Terata, S. Ishida, S. Kyushin, T. Okutsu, T.
Takeuchi, H. Hiratsuka, Silylation improves
photodynamic activity of tetraphenylporphyrin
derivative in vitro and in vivo, Chem. Eur. J., 20,
6054-6060(2014). [査読有] DOI:
10.1002/chem.201303120

〔学会発表〕(計 59 件)

S. Kasahara, H. Horiuchi, T. Okutsu, Protein
crystallization induced by surface plasmonic
resonance in International Space Station
"KIBO", 日本化学会第 97 春季年会, 3 月
16 日, 2017, 横浜.

T. Mashimo, H. Horiuchi, T. Okutsu, The
activatable photosensitizer using irreversible
sonochemical reaction, 日本化学会第 97
春季年会, 3 月 17 日, 2017, 横浜.

M. Isogai, H. Horiuchi, K. Hirakawa, T.
Okutsu, The Study of pH-Responsive
Photosensitizer for Improving Water
Solubility. 日本化学会第 97 春季年会, 3
月 16 日, 2017, 横浜.

奥成歩・堀内宏明・奥津哲夫, リゾチー
ムの光化学反応の初期過程, 平成 28 年度
日本化学会関東支部群馬地区研究交流発
表会, 12 月 13 日 2016, 高崎.

T. Okutsu, T. Taguchi, Y. Takase, M Utsumi,
H. Horiuchi, Photochemically induced
crystallization of lysozyme, The 18th
International Conference on Crystal Growth
and Epitaxy (ICCGE18) 7-12 August 2016
Nagoya.

奥津哲夫・中村清明・横山大・堀内宏明,
タンパク質の光誘起結晶化におけるテン
プレート分子, 2016 年光化学討論会, 東京
大学, 9 月 8 日 2016 年, 東京大学.

S. KASAHARA, Y. AMANO, H.

HORIUCHI, T. OKUTSU, Photochemically
induced crystallization of protein in
Internatiomnal Space Station "KIBO", 2016
年光化学討論会, 9 月 8 日 2016 年, 東京
大学.

K. SUGIYAMA, T. TAGUCHI, H.
HORIUCHI, T. OKUTSU, The
photochemical reaction of amino acid
residue that induces protein crystallization,
The 5th Annual Southern California System
Biology Conference, 1 月 31 日, 2016
California Irvine, USA.

H. Horiuchi, A. Hirabara, R. Kuribara, S.
Torii, T. Okutsu, Development of
pH-activatable Photosensitizer for
Photodynamic Therapy, 2nd International
Symposium of Gunma University Medical
Innovation, 12 月 8 日, 2015, Maebashi.
他 50 件

〔図書〕(計 3 件)

T. Okutsu, Springer, Advances in Organic
Crystal Chemistry Comprehensive Reviews,
2015, Chapter 1, 3-14.

光化学の事典, 朝倉書店 (2014 年) 堀内
宏明(分担, p.260-261) [査読無]
光化学の事典, 朝倉書店 (2014 年) 奥津
哲夫(分担) [査読無]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥津 哲夫 (OKUTSU, Tetsuo)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号: 20261860

(2) 研究分担者

堀内 宏明 (HORIUCHI, Hiroaki)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号: 00334136

高橋 浩 (TAKAHASHI, Hiroshi)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号: 80236314