

研究課題別評価

1 研究課題名: 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

2 研究者氏名: 出羽 毅久

3 研究の狙い:

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。もし、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と期待できる。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、複数の膜タンパク質からなる集合体のドメイン中での機能的組織化を目的とする。そのためには、膜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をハイブリッド化させ、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。さらに多成分の膜タンパク質の脂質ドメイン中での組織化とその機能(触媒反応等)の検討へと展開し、ナノプラント構築の可能性を探る。

4 研究結果:

(1) 大腸菌発現系を用いたアンテナ系膜タンパク質の発現と脂質二分子膜中での組織化

・ ジスルフィド化リン脂質による脂質ドメイン選択的な疎水性ポリペプチドの組織化

膜タンパク質として、光合成細菌のアンテナ系膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)を用いた。このポリペプチドは光合成色素(バクテリオクロフィル類)と複合体を形成することにより、色素の吸収帯が著しく長波長シフトする。このポリペプチドの特性に注目し、大腸菌発現系によりポリペプチドの末端領域にシステインを導入したミュータントを作成し、ジスルフィド化リン脂質を用いて脂質-疎水性ポリペプチド間の相互作用を調節することにより脂質二分子膜中でのポリペプチド/色素複合体の形成能を検討した。その結果、ジスルフィド化リン脂質の流動性が高い(相転移温度が低い)膜中ほど複合体サイズは小さくなり、逆に、流動性の低い脂質中ではより大きな複合体形成が観測された。このことから、流動性の高いリン脂質とのジスルフィド架橋により、脂質二分子膜中におけるポリペプチド間相互作用を制御できることが示唆された。この結果を受け、上述のジスルフィド化リン脂質(液晶相)と低流動性リン脂質(ゲル相)の二成分相分離系からなる脂質二分子膜中でのポリペプチド/色素複合体形成を調べた結果、前者が形成する脂質ドメイン中に選択的に配置されていることを示す結果が蛍光エネルギー移動により示唆された。

・ 脂質-膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)コンジュゲートの作成

上述のドメイン選択的な疎水性ポリペプチド(膜タンパク質)の組織化をさらに明確にするために、あらかじめポリペプチドとリン脂質をジスルフィド架橋したコンジュゲートを用いることを検討したが、単離精製が困難を極めた。そこで、大腸菌発現系により得られていた水溶性のマルトース結合タンパク質(MBP)との融合体を用いることにより、この問題点を克服することができた。(現在、大量合成、および脂質二分子膜への導入を検討中)

・ マルトース結合タンパク質(MBP)との融合体の予期せぬ複合体形成

MBP 部位は疎水性ポリペプチドに比べて分子量で約10倍(40kDa)の大きさを有する。しかし、この融合体は MBP の存在にかかわらず、疎水性ポリペプチド部位が光合成色素と複合体(二量体)を形成することがわかった。また、この二量体は脂質二分子膜中に導入可能であり、加水分解によりMBP部位を切除することが可能であることが見いだされた。

さらに、この立体的に大きな MBP の除去により膜中でポリペプチド／色素複合体がさらに会合することが見いだされた。ここで得られた知見は、水溶性の MBP により脂質二分子膜に対する疎水性ポリペプチドの方向性を制御しうる可能性を示している。(現在進行中)

(2)脂質-膜タンパク質ハイブリッドの脂質ドメインへの組織化と蛍光顕微鏡による観察

・ 非相容系脂質二分子膜のドメインの観察

巨大ベシクルおよびガラス基板上で二分子膜化させたものについて、脂質二分子膜などの界面観察に適した全反射照明による蛍光顕微鏡により、そのドメイン形成を確認した。その結果、特にカチオン性に表面処理したガラス基板上に二分子膜化させたものについて、大きさ約2~5 μm の明確な脂質ドメインが観察できた。

・ドメイン選択的な膜タンパク質(MBP 融合タンパク質)の組織化の観察

上述の MBP 融合タンパク質の蛍光ラベル化を行い、観察可能となった脂質ドメイン中に選択的に組織化される様子を全反射照明による蛍光顕微鏡により観察する(予定)。また、加水分解処理により MBP を切除し、ドメイン内で疎水性ポリペプチド部位が集合するプロセスを観察する(予定)。

4-2 (今後の予定) ナノプラントとしての可能性: 二成分系膜タンパク質(アンテナ複合体／光反応中心複合体等)の組織化と機能評価

これまで得られた結果から、アンテナ複合体を形成する疎水性ポリペプチドを脂質二分子膜の流動相ドメインに配置できることが分かってきた。本研究題目にある“ナノプラント”の構築のために、このドメイン中にアンテナ複合体と光反応中心複合体(RC)が共存するように配置させることを試みる。ドメイン内で組織化することにより光合成膜で行われている光収穫→電荷分離がより効率よく行われると期待する。また、異なるアミノ酸配列からなる疎水性アンテナポリペプチドを用いることにより、吸収／発光波長を変化させることが可能となる。そこで、二成分系アンテナ複合体間のエネルギー移動効率におよぼす脂質ドメインの効果も検討する。

5 自己評価:

研究の発展性:ここまで得られた成果から、ジスルフィド結合を有する脂質ドメインに膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)を選択的に組織化する方法を部分的ではあるが確立することができた。対象とした膜タンパク質は光合成系のアンテナタンパク質であるので、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)をドメイン内に組織化することが可能となると期待できる。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により脂質二分子膜系で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。今のところ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。

6 研究総括の見解:

出羽毅久研究員は、分子膜中へのタンパク質複合体の導入について検討を行い、膜の組成とタンパク質の組織化について明らかにしてきている。特に、光合成でのアンテナ膜タンパク質複合体に着目して、タンパク質複合体形成における膜ドメインの影響を分子レベルで可視化する手法を開発しおり、タンパク質の組織化と膜構造との関係について、より明らかになることが期待される。

7 主な論文等:

- 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, *Submitted to Biochemistry*

- 2) “Effect of Lipid-polypeptide Interaction on Self-assembling Properties of Hydrophobic Polypeptide/Pigment as a Bacterial Light-harvesting Complex”, T. Dewa, M. Sugimoto, K. Yoshida, K. Yamashita, and M. Nango, *In Preparation for submitting to Biochemistry*
- 3) “Lipid-domain Selective Protein Assembly of a Hydrophobic Polypeptide/pigment”, T. Dewa, M. Sugimoto, K. Yoshida, K. Yamashita, and M. Nango, *In Preparation for submitting*
- 4) “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, 824-830 (2004).