

1本の疎水鎖末端をフッ素化した 新規部分フッ素化リン脂質シリーズの開発

群馬大学大学院理工学府理工学専攻 博士前期課程2年(助成時)
同上 博士後期課程1年(現在)

中川原 亜依

研究背景と目的

生体膜(図1)の構成要素である脂質は、膜タンパク質の高次構造形成や機能発現に大きく関与することから、生体膜の研究分野では脂質—膜タンパク質相互作用が重要である。*in vitro* 実験では、天然膜中から膜タンパク質を抽出し、人工脂質膜に再度組み込んだ(再構成)状態での解析が必要になるが、市販の脂質を用いた実験では、天然の膜タンパク質の構造や機能を保持できない場合がある。そのため、生存環境を含む様々な実験条件において、膜タンパク質の構造と機能を維持できる脂質ライブラリーの構築が望まれている。そこで両親媒性分子への導入で際立って特異な物性を示すパーフルオロアルキル(R_f)基に注目し、1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC、図2(A))の2本のアシル鎖末端の両方に R_f 基を導入した部分フッ素化リン脂質、Fn-DMPC(図2(A))が開発された。Fn-DMPCは R_f 鎖長に依存的な膜物性⁽¹⁾を示し、さらに膜タンパク質の再構成材料としての有用性⁽²⁾が示された。本研究では、部分フッ素化リン脂質の化学構造の制御因子として R_f 鎖の導入数に注目し、リン脂質の2本のアシル鎖のうち1本のみ R_f 鎖を導入したFn-Hybrid(図2)を考案した。そして、その合成と膜物性解析、膜タンパク質研究の材料として評価を行った。

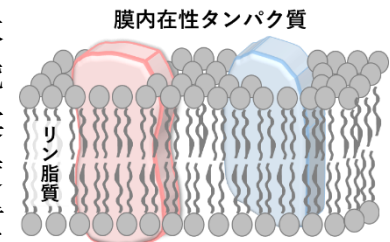


図1 生体膜の模式図

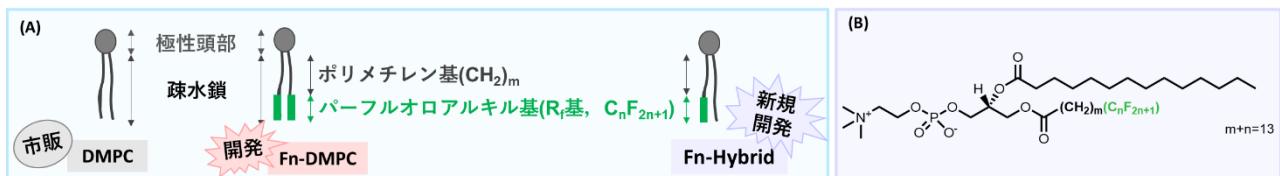


図2 (A) 部分フッ素化リン脂質の模式図 (B) Fn-Hybridの化学構造

Fn-Hybridは既存の方法⁽³⁾に従い合成し、脂質二分子膜の膜物性をX線回折測定と示差走査熱量測定(DSC)により調べた。また、膜タンパク質のひとつであり、天然紫膜(Purple Membrane, PM)中で、三量体が自主的に集合した二次元結晶(図3(A))を形成するバクテリオロドプシン(bR)を用いた再構成試料の構造と光サイクルを調べた。なお、bRは光照射により様々な中間体を経て、最初の状態に戻る、光サイクルによって1つのプロトンを送る機能(図3(B))を持つことが知られている。

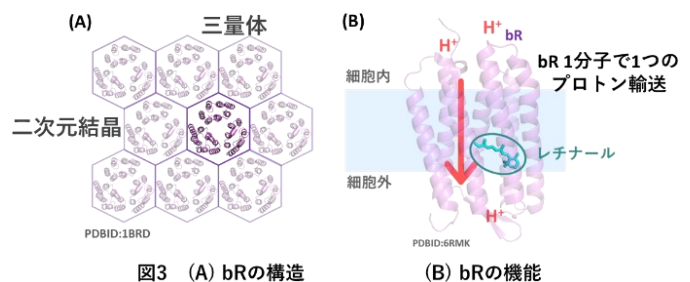


図3 (A) bRの構造 (B) bRの機能

結果と考察

今回は特に F4-Hybrid について得られた結果を記述する。F4-Hybrid の DSC と X 線回折測定の結果、0 °C 付近に相転移 (図 4(A)) が 2 つ現れ、相転移温度は非フッ素化の DMPC や F4-Hybrid と同じ長さの R_f 鎖を持つ F4-DMPC よりも低下した。さらに、F4-Hybrid の主転移に相当すると考えられる高温側の転移に伴うエントロピー変化 (ΔS) が DMPC や F4-DMPC より小さい値を示した。広角 X 線回折ピークの幅の比較より、F4-Hybrid の相転移前の相状態は DMPC よりも乱れた構造であると分かり、**Hybrid 型**になると **R 鎖と R_f 鎖の配置の多様性** (図 4(B)) により、相転移前のエントロピーの絶対値が大きいと考えられ、結果的に ΔS が小さいことが示唆された。

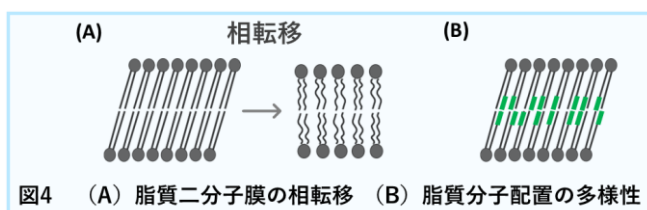


図4 (A) 脂質二分子膜の相転移 (B) 脂質分子配置の多様性

さらに、F4-Hybrid に再構成した bR (bR/F4-Hybrid) の 30 °C での四次構造を円二色性 (CD) スペクトル測定により調べると、bR/PM 類似の三量体を形成する bR/F4-DMPC とは異なる結果が得られ、むしろ、単量体である bR/DMPC と類似のパターンが得られた。しかし、bR/F4-Hybrid の光サイクルの速さは 100 ミリ秒程度と bR/PM や bR/F4-DMPC と同等であり、bR/DMPC より速いという興味深い特徴が明らかになった。光サイクルが速くなる原因は膜タンパク質 (bR) 同士の相互作用だと考えられ、単量体になった場合はこの相互作用が働かないため遅いと従来考えられている。つまり bR/F4-DMPC では、脂質比率が bR/PM よりも遙かに高いが、F4-DMPC と bR の親和性の低さから bR が自主的に集合 (bR-bR 相互作用) し、図 3(A) のような bR/PM に近い構造を取るとされる⁽²⁾。一方、F4-Hybrid 膜中 bR は bR-bR 相互作用が働かず、三量体のような bR 集合体にはならないが、bR-bR 相互作用に置き換わるような**脂質-膜タンパク質 (F4-Hybrid-bR) 相互作用**により、**bR の機能発現に有利な構造 (図 5)** を形成している可能性が考えられる。ただ、四次構造を CD スペクトルのみで判断するのは困難との指摘も知られているため、今後は他の実験手法により単量体であることを確認する必要がある。

さらに、F4-Hybrid に再構成した bR (bR/F4-Hybrid) の 30 °C での四次構造を円二色性 (CD) スペクトル測定により調べると、bR/PM 類似の三量体を形成する bR/F4-DMPC とは異なる結果が得られ、むしろ、単量体である bR/DMPC と類似のパターンが得られた。しかし、bR/F4-Hybrid の光サイクルの速さは 100 ミリ秒程度と bR/PM や bR/F4-DMPC と同等であり、bR/DMPC より速いという興味深い特徴が明らかになった。光サイクルが速くなる原因は膜タンパク質 (bR) 同士の相互作用だと考えられ、単量体になった場合はこの相互作用が働かないため遅いと従来考えられている。つまり bR/F4-DMPC では、脂質比率が bR/PM よりも遙かに高いが、F4-DMPC と bR の親和性の低さから bR が自主的に集合 (bR-bR 相互作用) し、図 3(A) のような bR/PM に近い構造を取るとされる⁽²⁾。一方、F4-Hybrid 膜中 bR は bR-bR 相互作用が働かず、三量体のような bR 集合体にはならないが、bR-bR 相互作用に置き換わるような**脂質-膜タンパク質 (F4-Hybrid-bR) 相互作用**により、**bR の機能発現に有利な構造 (図 5)** を形成している可能性が考えられる。ただ、四次構造を CD スペクトルのみで判断するのは困難との指摘も知られているため、今後は他の実験手法により単量体であることを確認する必要がある。

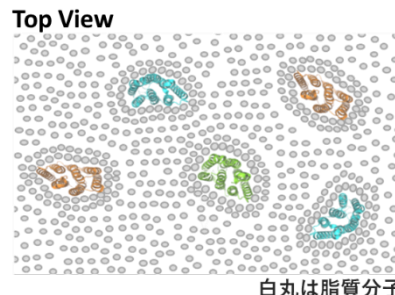


図5 bR/F4-Hybridの解釈例

結論

DMPC の部分フッ素 Hybrid 化は相転移温度を低下させる効果がある。また、F4-Hybrid 膜へ再構成された bR は bR/DMPC や bR/F4-DMPC とは異なる振る舞いを示した。そして、天然紫膜中 bR とは多量体構造が異なるにも関わらず、その機能性は保持するという、これまでにない特異な脂質膜の創生につながる基盤を、Hybrid 型部分フッ素化リン脂質により構築することができた。

参考文献

- (1). K. Morita, *et al.*, *Chem. Lett.*, **48**, 1105(2019).
- (2). M. Hashimoto, *et al.*, *BBA Biomembranes.*, **1863**, 183686(2021).
- (3). K. Takai, *et al.*, *J. Fluorine Chem.*, **129**, 686(2008).