

膜貫通タンパク質の脂質ベシクルへの再構成における タンパク質と脂質の割合と粒径の関係

Relationship between the reconstituted vesicle size and the transmembrane protein to lipid ratio

明大理工, °木村 俊介, 加藤 徳剛, 佐々木 貴規

Meiji Univ. °Shunsuke Kimura, Noritaka Kato, Takanori Sasaki

E-mail: ce21026@meiji.ac.jp

背景・目的 界面活性剤で可溶化された膜貫通タンパク質を、脂質ベシクル内に再構成する際に、界面活性剤／タンパク質／脂質混合系から、界面活性剤を吸着材により、徐々に取り除く方法が取られる[1]。我々は、光駆動型 Cl^- ポンプである *Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシン (NpHR) を用いて、ベシクルへの再構成を行っている。7 回膜貫通型タンパク質の三量体である NpHR を用いて、膜貫通タンパク質による脂質膜の透過性や、脂質膜中での三量体形成の制御を目的に研究を行っている。脂質として 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) を用いて、NpHR をベシクル膜内に再構成すると、ベシクルの粒径分布が、脂質に対する NpHR の濃度に対して著しく変化することを見出した。そこで本研究では、脂質の種類や NpHR と脂質の割合が、再構成後のベシクルの粒径分布に与える影響を明らかにすることを目的とした。

実験方法 2.25mM の TritonX-100 で可溶化した NpHR に DMPC を混合し、モル比にして NpHR : DMPC = 1:208 または 1:431 の界面活性剤／タンパク質／脂質混合系を用意した。このとき NpHR の濃度は約 $3\mu\text{M}$ である。そこに吸着材である Bio-Beads を、1 時間ごと 4 回に分けて、最終的に重量比にして TritonX-100 : Bio-Beads = 1:40 になるように加え、TritonX-100 を除去し、再構成を行った。TritonX-100 の除去は蛍光スペクトルで確認し、ゲルクロマトグラフによりベシクルへの NpHR の挿入を確認した。再構成したベシクルの粒径分布は、動的光散乱法により評価した。

結果と考察 2.25mM の TritonX-100 で DMPC のみを可溶化させ、同様の手順でベシクルを再構成すると、多分散な粒径分布を示した (Fig.1(a))。NpHR : DMPC = 1:431 で再構成したら、Fig.1(b) のように粒径分布が 700nm 付近に集中し、脂質の割合が低い NpHR : DMPC = 1:208 の場合は、450nm 付近に単一のピークをもった分布が得られた (Fig.1(c))。従って、NpHR は再構成後のベシクルの粒径を 200~1000nm に揃える効果があることが分かった。また、Fig.1(b) で観測された粒径 10^4nm 付近の凝集体は、DMPC のみの場合 (Fig.1(a)) にも観測されたことから、脂質のみの凝集体であるとする、NpHR : DMPC = 1:431 では NpHR に対して脂質が過剰であり、1:208 では全てのベシクルに均一の割合で NpHR が挿入されているものと解釈できる。このように、再構成の際に最適な NpHR と脂質の割合が存在するのかどうかを明らかにするとともに、NpHR に対する DMPC の割合、温度や脂質の種類を変えて、これらが再構成後のベシクル粒径に与える影響を明らかにする。

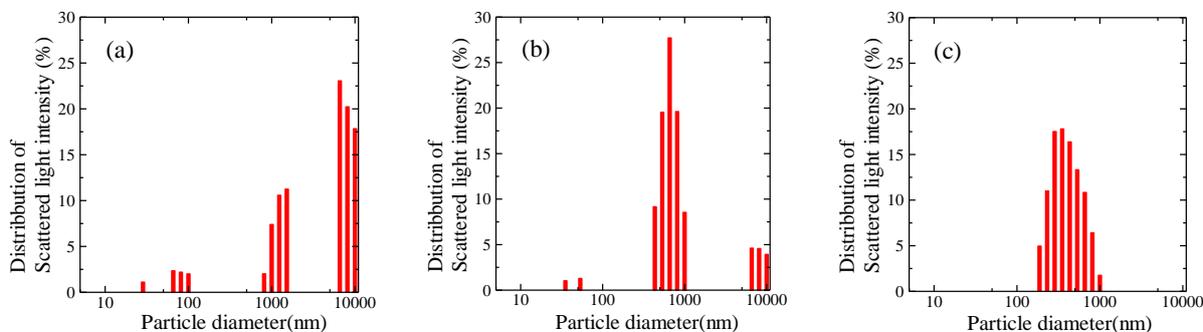


Fig.1 Size distribution of the reconstituted vesicles. (a) Absence of NpHR, (b) NpHR:DMPC = 1:431, and (c) NpHR:DMPC = 1:208.

[1] F. Madani, A. P. Marin, and A. Graslund, *Journal of Drug Delivery* 2011, 897592.