

## 膜貫通タンパク質／脂質混合ベシクルの粒径に対する 混合比依存性とタンパク質の組織化との関係

### Dependence of reconstituted vesicle size on transmembrane protein to lipid ratio and its relationship to protein association

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](mailto:ce21026@meiji.ac.jp)

**背景・目的** 膜貫通タンパク質の脂質二重膜中での組織化は、タンパク質の機能性に影響を与えるとされ、強い関心を集めている[1]。この組織化は、脂質二重膜と膜貫通タンパク質の疎水部の厚さの差(疎水性ミスマッチ)に起因していると考えられ、疎水性ミスマッチが大きいと膜貫通タンパク質は脂質二重膜中で集合し、小さいと膜貫通タンパク質は分散する[1]。我々は、光駆動型 Cl<sup>-</sup>ポンプとして働く 7 回膜貫通タンパク質である *Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシン (NpHR) [2]を用いて、脂質ベシクルを再構成すると、脂質と NpHR の混合比にその粒径が著しく依存することを見出した[3]。そこで、再構成したベシクルの粒径と、疎水性ミスマッチに起因する NpHR の組織化との関連性を明らかにすることを目的とし、厚さの異なる 2 種類の脂質を用いて、脂質と NpHR の混合比を系統的に変化させ、再構成ベシクルの粒径を計測した。なお、NpHR は bacteriorhodopsin(bR)と構造がほぼ同一なため[4]、疎水部の厚さは約 30 Å と考えられる[5]。用いた脂質の二重膜の疎水部の厚さは、1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC)の場合は約 29 Å、1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine(SOPC)の場合は約 30 Å である[6]。

**実験方法** 150mM の NaCl を含むトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中に、2.25mM の TritonX-100 で可溶化した NpHR と脂質を任意の混合比で用意した。そこに吸着剤である Bio-Beads を、最終的に重量比にして TritonX-100 : Bio-Beads=1:40 以上になるように 4 回に分けて加え、TritonX-100 を除去し、ベシクルを再構成した。ベシクルの粒径は動的光散乱法で評価した。

**結果と考察** POPC のみを TritonX-100 で可溶化させ、ベシクルを再構成すると、平均粒径は約 140nm であった(Fig.1, Red line)。NpHR を混合した場合、NpHR:POPC=1:2000~800 で再構成すると、平均粒径は 200nm 付近になり、POPC のみで再構成したベシクルの粒径と大差なかった(Fig.1)。

NpHR の割合を NpHR:POPC=1:700~400 に増やすと、平均粒径は 500~800nm に増加し(Fig.1)、NpHR:POPC=1:400 より NpHR の割合を高めたら、凝集した。Fig.1 の粒径が不連続に変化した NpHR:POPC=1:800 と 1:700 の間で、タンパク質の集合が起きたと推察した。エマルジョン形成の自由エネルギーモデルを 2 次元に適応し、脂質二重膜中でのタンパク質の集合化に当てはめたところ、脂質二重膜と NpHR との線張力は、0.815pN/m となり、タンパク質／脂質界面の自由エネルギーは 2.28kcal/mol となった。この値は、他の膜貫通タンパク質で推定された値と類似した[7]。SOPC を用いた場合についても同様の評価を行っている。

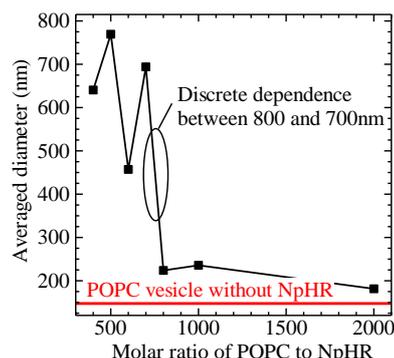


Fig.1 Averaged size of the reconstituted vesicles as a function of molar ratio of POPC to NpHR.

- [1]A. V. Botelho, T. Huber, T. P. Sakmar and M. F. Brown, *Biophysical journal* 2006, 4464-4477.  
 [2]T. Sasaki, N. W. A. Razak, N. Kato, Y. Mukai, *Biochemistry* 2012, 2785-2794.  
 [3]木村俊介, 加藤徳剛, 佐々木貴規, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会 2013, 29p-PB8-4.  
 [4]M. Kolbe et al, *Science* 2000, 288, 1390-1396.  
 [5]B. Pikhova, E. Perochon and J. F. Tocanne, *Eur. J. Biochemistry* 1993, 385-396.  
 [6]N. Kucerka, Mu-Ping Nieh, J. Katsaras, *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 2761-2771.  
 [7]P. Wiggins and R. Phillips, *Biophysical journal* 2005, 880-902.