

単一巨大単層ベシクル内膜タンパク質機能と膜力学物性との関連

Relationship between the function of membrane protein in giant unilamellar vesicle and membrane mechanical properties

群馬大¹, 兵庫県立大² °茂木 俊憲¹, 田丸 翠允¹, 岡田 優里¹, 住友 弘二²

Gunma Univ.¹, Univ. of Hyogo², °Toshinori Motegi¹, Akichika Tamaru¹, Yuri Okada¹, Koji Sumitomo²

E-mail: tmotegi@gunma-u.ac.jp

【序】 生体膜内の膜タンパク質は生命活動に重要な反応に関わる機能素子であり、その構造や機能を調べるために生体膜の構成要素を単純化した人工脂質膜が用いられる。特に、巨大単層脂質膜ベシクル(GUV)は細胞同等サイズであり、マイクロピペット吸引法などより、タンパク質による膜張力や膜曲率等の力学特性への影響が調べられている。また、膜タンパク質の機能は、膜疎水部厚さ、流動性などの膜物性と密接に関連している。初めに、膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)を GUV へ組み込み、bR 機能発現による膜力学特性への影響を顕微鏡観察から評価した。さらに、異なる脂質系での比較から、bR と脂質間の分子レベルでの相互作用に依存する膜タンパク質機能と μm サイズの GUV の膜力学特性との関連を明らかにすることを目指した。

【実験】 脂質/chloroform 溶液を塗布した ITO 基板で 200 mM sucrose 水溶液を挟み、電場印加により GUV を調製した。また、界面活性剤法とベシクル融合法をそれぞれ用いて、GUV への bR 再構成効率を比較した。GUV には pH 低下とともに蛍光強度減少を示す色素 pyranine (λ_{ex} 455 nm, λ_{em} 509 nm)を内包し、bR プロトン輸送能を蛍光顕微鏡から評価した。GUV は 30 frame/s にて位相差顕微鏡観察し、各 frame で GUV 半径 r の自己相関が 0 となる円周長 ζ を算出した(Fig. 1)。

【結果】 bR が組み込まれた bR/POPC-GUV に 60 秒間光照射した場合に pyranine 蛍光が減少し、bR 機能発現に伴い GUV 内 pH が低下することがわかった(Fig. 2)。次に、POPC-GUV、bR/POPC-GUV および光照射下での bR/POPC-GUV の位相差像から

ら ζ を算出したところ、光照射下での bR/POPCGUV では ζ が減少し、曲げ弾性率の減少が示唆された。また、egg-PC、DOPC からなる GUV 系との比較から、脂質膜組成に依存した bR のプロトン輸送能と曲げ弾性とが密接に関連することが示唆された。本研究により、膜タンパク質活性発現と膜力学特性との関連を評価する手法を確立した。今後、膜曲率変化により機能するチャネル膜タンパク質を GUV へ組み込むことで、細胞が機械刺激を感知する際の分子機構解明に役立つ。

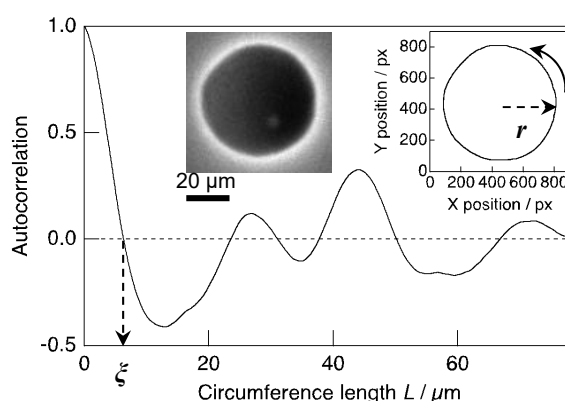


Fig. 1. POPC-GUV における円周長に対する半径 r の自己相関解析結果. (inset) GUV の位相差像と画像解析から得た GUV 輪郭.

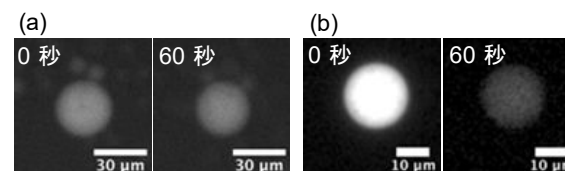


Fig. 2. GUV 内 pyranine の蛍光顕微鏡像. (a) POPC-GUV, (b) bR/POPC-GUV での結果.