3P121

膜貫通ヘリックス会合の熱力学量の測定: 疎水部ミスマッチの影響

○矢野 義明、松崎 勝巳 (京大院薬)

膜中でのヘリックス間相互作用は、多くの膜タンパク質のフォールディングの中核をなす重要な過程である。また、脂質組成によって多くの膜タンパク質の活性に影響を受けることから、脂質組成がヘリックス間相互作用に影響を与えると考えられるが、これらを実験的に定量した例は非常に少ない。近年、モデル膜貫通ヘリックスを用いてヘリックス会合を計測する手法が盛んになってきたが、多くの場合膜環境としてミセル系を用いており、通常の生体膜に見られる二分子膜環境を正しく反映しているとは言い難い。我々は、これまでに蛍光励起エネルギー移動 (FRET) 法を利用して脂質二分子膜系でのヘリックス間会合の熱力学量を計測可能な他に類を見ない実験系を確立してきた。今回、脂質フォスファチジルコリンのアシル鎖の長さを系統的に変化させて膜厚を変え、ヘリックス間膜間に疎水部ミスマッチを作り出した場合、会合がどう影響を受けるか検討した。約 30 Å のヘリックス長を持ち、逆平行型 2 量体を形成する inert なモデルペプチド X-(AALALAA)₃-Y [X = NBD, Y = NH₂ (I) or X = Ac, Y = DABMI (II)] を用いた。(I) から (II) への FRET 効率は、逆平行型および平行型ヘテロダイマーで各々 95% 以上、15% 以下と予想され、逆平行型会合を特異的に検出できる。膜疎水部厚を 20 Å から 34 Å まで変化させると、厚い膜でより強い会合が見られ、ミスマッチの程度が大きいくほど強く会合するわけではないことがわかった。会合自由エネルギーは約 -10 kJ/mol から -20 kJ/mol まで減少し、エンタルピー項の大きな減少 (-32 kJ/mol) が駆動力となっていることが明らかになった。ヘリックスマクロ双極子間の静電的な引力が、膜中でのヘリックス会合の basal な駆動力として重要であり、その強さは疎水部ミスマッチによるヘリックス末端の極性環境変化に応じて大きく変わることが示唆された。

Y. Yano and K. Matsuzaki : Effect of hydrophobic mismatch on thermodynamics for self-association of a transmembrane helix

3P123

リン脂質によるウシ心筋 NADH-ubiquinone oxidoreductase(複合体 I) の安定化

○杉山 英久、中坪 良平、寺田 浩人、伊藤 新澤 恭子、吉川 信也 (兵庫県大院・理・生命理学)

NADH-ubiquinone oxidoreductase (複合体 I) は、ミトコンドリア呼吸鎖の最上流部に位置し、NADH を酸化してユビキノンに電子を伝達すると共に、膜の内側から外側へとプロトンの能動輸送を行う。ミトコンドリア呼吸鎖の他の複合体 (II, III, IV, V) については、X 線結晶構造が明らかにされ、立体構造に基づいた反応機構の解明がされているのに対し、この複合体 I については、いまだその組成さえはっきりせず、反応機構に関する情報はほとんど無いというのが現状である。それは、この複合体 I が 43 種以上のサブユニットからなる巨大で複雑な膜タンパク質であるため、結晶化に耐えうるような安定な標品が得られていないことによる。そこで我々は、ウシ心筋ミトコンドリアから健全で高純度な複合体 I 標品の精製を試み、全行程を 2 日で終了する新しい精製法を確立してきた。精製された酵素はミトコンドリア膜中にあるときと同じように NADH からユビキノン (本研究では Q1、Q2 又はデシルユビキノン) への電子伝達の特異的阻害剤であるピエリシジン A によって 90% 以上の活性阻害をうけた。精製された複合体 I には限られた種類のリン脂質のみが含まれていることが分析により明らかになった。そこで、精製最終段階にウシ心筋から抽出精製されたホスファチジルコリンを添加した。すると、添加量によらず、常に酵素あたり約 200 分子という一定量のリン脂質を取り込むことが分かった。このようにリン脂質添加で安定化された酵素は、一定の角度を保った L 字型をしていた。透析により界面活性剤を除去していくと 2 次元的に配列している様子が電子顕微鏡により確認された。このことは、我々の精製方法で得られた標品は一定の構造を保って安定化されていることを示している。

H. Sugiyama, R. Nakatubo, T. Terada, K. Itou-Shinzawa, S. Yoshikawa : Stabilization of bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) with phospholipids

3P122

大腸菌発現の光捕集膜タンパク質の立体構造は天然のものと同じか？

○大友 征宇¹、望月 有志²、嶋田 友一郎²、鈴木 宏昭¹ (¹茨城大・理、²東北大・院工)

緑色植物を含む光生物は太陽の光エネルギーを効率的に集めるため、多数の光合成色素 (クロロフィル) と膜タンパク質からなる光捕集アンテナという精巧な分子集合体を用いている。光合成細菌由来のコアアンテナ (LH1) を構成する膜タンパク質複合体は疎水性が高く、結晶化が困難なため、原子レベルの構造はまだ得ていない。当研究室では、先に溶液中における紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来の光捕集膜タンパク質 LH1 α と β (約 6.5 kDa) の立体構造解析を行い、膜貫通ドメインと色素配位部位の構造的特徴を考察した (1)。さらに大腸菌発現系を用いてこれらの膜タンパク質の大量発現に成功し、発現産物の詳細な特性評価を行ってきた (2)。本発表では、大腸菌系で発現した LH1 β 膜タンパク質の溶液中における立体構造を NMR 法で決め、天然のものと比較した結果を報告する。発現した LH1 β 膜タンパク質は C 末端に His-tag をもち、同位体標識は光合成細菌の加水分解物を用いて行った (3)。2D ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルにおいて、37℃ で発現した LH1 β では C 末端に近い一部のアミドシグナルが消失したのに対して、30℃ で発現したものでは全てのアミドシグナルが観測された。発現温度による C 末端の構造が異なることが示唆された。さらに詳細な構造解析を行った結果、30℃ で発現した LH1 β は天然のものと基本的に同じコンフォメーションを保持しており、膜貫通領域に対応する部分はシングルヘリックス構造であることが明らかとなった。

References: (1) Z.-Y. Wang, et al., *J. Mol. Biol.* **347**, 465-477(2005); (2) Y. Shimada, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1942-1948(2004); (3) H. Suzuki, et al., *Anal. Biochem.* (2005, in press).

S. Otomo, Y. Mochizuki, Y. Shimada, and H. Suzuki : Examination of the solution structures between native and *E. coli* -expressed light-harvesting membrane proteins

3P124

蛋白質 ¹³C と脂質 ²H, ³¹P 間の相関固体 NMR による膜タンパク質構造解析法

○原田 英里砂^{1,2}、戸所 泰人¹、藤原 敏道¹、阿久津 秀雄¹ (¹阪大・蛋白研・機能構造、²JBIC)

タンパク質・リン脂質二重膜系において、距離情報を利用して両者の相対的な位置関係を知り構造を決めることは、タンパク質の機能を調べる上で重要である。今回、³¹P, ²H と ¹H との間で複数回の交差分極 (CP) を行うことで感度よく、³¹P, ²H からおよそ 5 Å の近傍に位置する ¹H のみを選択的に ¹³C で観測する相関固体 NMR 方法を開発した。この方法を膜蛋白質の構造解析のモデルとして脂質に結合した両親媒性の α -ヘリックス構造を持つ 14 残基のペプチド (¹³C, ¹⁵N ラベル) マストパラン X (INWKGIAAMAKKLL-NH₂) に適用した。試料は脂質 (DPPC : DPPG = 4 : 1) に対して重量比 10 : 1 で結合させ、相対湿度 32% に調整したものを使った。ここで、脂質親水基の ³¹P との相関を観測する以外に、脂肪鎖が重水素化された脂質と、脂質頭部まで重水素化された脂質の 2 種類を作成したことで、脂質頭部に近い残基をより明確に区別できるようになり、脂質膜とペプチドの相対的な位置情報を得た。実験結果からマストパラン X は疎水性残基が膜と、親水性残基が水と接するように膜表面に位置していることが示された。さらにリン脂質膜・ペプチド・水の複合体構造を定量的に明らかにするために、複合体モデルに基づいて相関スペクトルをシミュレーションすることにより構造解析を進めている。ここで、²H の相関から脂質膜を固定したときにペプチドの深さを変えたモデルの結果からペプチドは脂質膜内部まで埋まってはならず、ヘリックス軸を回転させたモデルから、疎水性残基が脂質に接するようなヘリックス軸の回転角度を 60 度まで絞り込むことができた。今後は ³¹P との相関結果を含めさらに解析を進め、モデル構造を精密化する予定である。

E. Harada, Y. Todokoro, T. Fujiwara and H. Akutsu : Structural analysis of membrane protein by solid-state correlation NMR between protein-¹³C and lipid-²H, ³¹P