●特集 生体膜と人工膜の接点

古細菌モデル糖脂質の膜特性と そのバイオテクノロジー分野への応用

馬場照彦

産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門 〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5

Membrane Properties of Modeled Archaeal Glycolipids and Their Biotechnological Application

Teruhiko Baba

Nanotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba
Central 5, Higashi, 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

Because archaeal lipids are considered to be chemically and physically stable, it is of great interest to utilize these lipids as biotechnological materials. We have developed and proposed modeled archaeal diether-type (phytanyl-chained) glycolipids, a series of 1,3-di-*O*-phytanyl-2-*O*-(β -maltooligoglycosyl)glycerols. This review discusses basic membrane properties of the proposed glycolipids, i.e., membrane-formability, intermembrane interaction, proton permeability, and intramembrane environment; subsequently usefulness of these membranes as reconstitution matrices for energy-conversion membrane proteins by employing such as labile oxygen-evolving photosystem 2. The characteristics of the proposed glycolipids are expected to lead to a new class of artificial membrane matrices for basic science such as glycobiology as well as for biotechnological applications.

Key words : archaeal glycolipid / colloidal stability / proton permeability / intramembrane environment / membrane protein / functional reconstitution

1. はじめに

古細菌 (Archaea) は苛酷な環境下 (100℃以上の熱水温～冷温, 強酸性～強アルカリ性, 高塩濃度, 無酸素状態など) に棲息する生物群であり, 真正細菌 (Eubacteria), 真核生物 (Eukaryotes) と並んで, 全生物界を構成する第3の生物と考えられている。その生態的特徴から, 菌体を構成する膜や各種蛋白質群などは, 通常の生物のそれより高い安定性を有すると考えられる。このため生

命起源を解明しようとする基礎生物学の分野のみならず, 安定な生体分子材料を探索し, バイオリアクタ・センサなどのデバイスを構築しようとするバイオテクノロジー分野においても, 古細菌由来分子は注目されつつある。中でも古細菌脂質 (Fig. 1) は, 真正細菌や動植物由来の脂質とは異なり, 1) 疎水鎖と glycerol は ether 結合のみで結合している, 2) glycerol 骨格の立体化学は, 通常の脂質 (*sn*-glycero-3-phosphate 型) とは対掌関係の *sn*-glycero-1-phosphate 型のみである, 3) 疎水鎖は

Fig.1 Chemical structures of typical backbone of archaeal lipids: (A-D) diethers; (E, F) tetraethers. (A) 2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol (archaeol); (B) macrocyclic archaeol; (C) β -hydroxy archaeol; (D) α -sesterterpanyl archaeol; (E) tetraethers without cyclized chains; (F) tetraethers with monocyclized chains. For tetraethers, R = R1: caldarchaeol (GDGT, glycerol-dialkyl-glycerol tetraethers), R = R2: nonitolcaldarchaeol (GDNT, glycerol-dialkyl-nonitol tetraethers). Taken from Ref. 2).

Fig.2 Chemical structures of modeled archaeal glycolipids 1,3-di-*O*-phytanyl-2-*O*-(β -D-maltooligoglycosyl) glycerols (Glc(Phyt)₂, Mal_N(Phyt)₂ ($N = 2, 3, 5$)).

多くの分枝methyl基が存在する分枝鎖である、4) 通常の脂質のように極性基1つを有するdiether型脂質以外に、極性基2つを有するtetraether型脂質が存在する、といった構造的特徴を有する^{1,2)}。苛酷な環境に耐える安定な膜系形成には、このような構造上の特徴が重要な意味を持つと考えられ、他方、安定な膜材料としての応用も検討されつつあるが、汎用脂質に比してその入手は容易でない。このため、古細菌脂質の物性や応用に関する検討^{2~5)}は、リン脂質型のモデル脂質^{6~8)}も含め、依然として限られている。

これらを背景として、我々は、diether型の古細菌モデル糖脂質であるphytanyl鎖型糖脂質群 (Glc(Phyt)₂, Mal_N(Phyt)₂ ($N = 2, 3, 5$), Fig. 2) を新たに提案・開発した⁹⁾。一般に、glycero糖脂質¹⁰⁾およ

びsphingo糖脂質¹¹⁾のゲル-液晶相転移温度 (T_m) は、同じ疎水鎖長の直鎖型リン脂質に比べて高く、よってリン脂質に比べて使用し難い。しかし直鎖に代わるphytanyl鎖は T_m を低下させる効果があり⁶⁾、リン脂質に比べて利用範囲が限定されていた糖脂質についても、広汎な利用の道を拓く可能性が出てきた⁹⁾。実際、開発した古細菌モデル脂質は広い温度範囲 ($-120 \sim 100^\circ C$) において液晶状態を呈し、かつmaltooligo糖鎖長に依存して水中での自己集合構造が変化する⁹⁾。また、苛酷な環境に適応する古細菌細胞膜のモデルであるだけに、後述するように膜透過性も低く、一般に液晶膜状態が機能発現に必須な膜蛋白質の反応場としても適すると考えられる。

本稿では、古細菌モデル糖脂質の膜特性 (コロ

Fig.3 Zeta-potentials of $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ vesicles in 1mM NaCl solution as functions of pH at 25°C. Solid (a, b, c) and dotted (d, e) lines are the simulation curves in the presence (adsorption energy: $-15.5 kT$, saturated adsorption amount: 6.0 mC/m^2) and in the absence of OH^- ion adsorption, respectively. Dissociation amount of hydroxyl groups of the saccharide headgroup of $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$: (a) 0 C/m^2 ; (b) 0.16 C/m^2 , $\text{pK}_a = 13$; (c) 0.48 C/m^2 , $\text{pK}_a = 13$; (d) 0.16 C/m^2 , $\text{pK}_a = 13$; (e) 0.48 C/m^2 , $\text{pK}_a = 13$. For details, see Ref. 12).

イド安定性・proton透過性)とエネルギー変換に関わる膜蛋白質の再構成膜基材としての有用性を、汎用されている直鎖型リン脂質と比較しつつ紹介する。

2. 古細菌モデル糖脂質の膜形成とコロイド安定性

Fig. 2に示した古細菌モデル糖脂質のうち、極性基が単・二糖のものは水中で非ラメラ液晶、三糖以上でラメラ液晶(二分子膜構造)を形成する⁹⁾。例えば $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ は純水の中で容易に膨潤し、汎用される直鎖型両性リン脂質の卵黄phosphatidylcholine (EPC)で観察されるように、ミエリン形やベシクル膜を形成して分散する。しかしEPCの場合とは異なり、低pHや塩を含む緩衝液中では膨潤し難く、分散性も著しく低下する。また、一度生成したベシクル分散液でも、緩衝液や塩溶液を添加すると、凝集・沈殿が観察される。

この挙動は、古細菌モデル糖脂質の利用にあたっては障害となるが、糖脂質固有の性質であると考えられ興味深い。そこで均一直径(約 $0.1 \mu\text{m}$)の $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ ベシクルを用い、pHや塩濃度を変えて、そのコロイド安定性を検討した¹²⁾。その結果、低pHで凝集、高pHで分散する可逆的なpH依存ベシクル凝集が観察された。粒径分布の追跡から、凝集・分散過程における膜融合は認められず、いわば剛体球のように挙動する。また電気泳動測定により表面電位(ゼータ電位)を評価すると、見かけ上、非イオン性である $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ ベシクルは、Fig. 3に示すように、広いpH範囲で負に帯電していることがわかった。ベシクルが分散するpH範囲では表面電位は大きくなり、1mM NaCl溶液中では、最大約 -60 mV にも達する(Fig. 3)。

糖脂質ベシクルが負に帯電する機構は、少なくとも2つの過程が考えられる。1つは、油水界面系での現象¹³⁾と類似する、bulkから膜表面への水酸イオンの吸着による帯電であり、糖鎖の水酸基と水酸イオンとの水素結合が関わると推測される。もう1つは、多糖類で報告¹⁴⁾されているように、pH11以上で糖鎖の水酸基が弱酸として解離・帯電するものである。これらの過程を考慮して膜表面電位とpHの関係についてfitting計算を行うと、Fig. 3の曲線bが得られ、単一のfitting parameterにより、NaCl濃度0~10mMの範囲の測定点分布を説明できた。これらのparameterは、水酸イオンの吸着エネルギーは水素結合相当の大きさの $-15.5 kT$ であること、糖鎖水酸基の解離定数は $\text{pK}_a = 13$ ¹⁴⁾で脂質1分子当たり1個の水酸基のみが解離することを意味している。

Fig. 3に示された溶液条件では、ベシクルはpH5.7以下で凝集するが、この閾pH近傍における表面電位は、NaCl濃度によらず約 -10 mV であった。帯電に伴う静電斥力とvan der Waals引力のみを考慮した古典的DLVO理論¹⁵⁾を適用すると、 -10 mV の表面電位では、二粒子間相互作用曲線の障壁の高さは熱エネルギーと同程度となり、この電位以下ではベシクルはBrown運動により容易に凝集すると予測される。事実その通りであり、この糖脂質ベシクルのコロイド安定性は、疎水性

コロイドを対象とするDLVO理論の範疇で扱えることがわかった。さらに直接表面間力測定により、Mal₃ (Phyt)₂ベシクルのコロイド安定性には、EPCベシクルで考えられている短距離斥力（水和力、膜揺らぎ力など）¹⁶⁾の寄与は小さいことが推測された¹⁷⁾。すなわち静電斥力がMal₃ (Phyt)₂ベシクル分散系の主たる安定化要因であると考えられ、この系は疎水性コロイドないしそれに近いものと言える。

以上の結果は、直ちに非イオン性糖脂質膜表面一般が疎水的であることを意味するものではないが、例えば天然糖脂質（digalactosyldiacylglycerol (DGDG)）膜は"dry surface"であるとする観察¹⁸⁾と併せて考えると、糖脂質表面の特徴と言えるかも知れない。いずれにせよ、古細菌モデル糖脂質ベシクル膜の形成や安定な分散状態を実現するには、荷電性脂質の添加による静電斥力の賦与などの方策が必要であると言える。

3. 古細菌モデル糖脂質の膜透過性と膜内環境

膜の物質透過性、特にproton透過性は、ミトコンドリアやチラコイド膜のようなエネルギー変換膜における膜蛋白質、例えばATP合成酵素の活性発現に必要なproton駆動力（PMF）を考える上で重要な物性である。高温条件下に棲息する古細菌でもPMFは必要であるため、その脂質膜のproton透過性は、高温で初めて常温菌のそれと同程度となるが、室温程度では同じ鎖長の直鎖型脂質に比べ、著しく低い^{2, 3, 7)}。分枝鎖型脂質であるMal₃ (Phyt)₂やdiphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC)も、直鎖型脂質のEPCやDGDGなどに対して、1/4～1/10程度低いproton透過性を示す^{19, 20)}。

protonの膜透過機構については、水和したprotonの溶解拡散モデルや、膜内の水分子が極めて一過的に水素結合により鎖状配列し、膜の両側を橋渡しする"proton wire"モデルが提案されている²¹⁾。後者の場合、鎖状配列した時点でproton jump機構により速やかに電荷が膜を横切る。これらのモデルの場合、少なくとも2つの因子がproton透過の速さ

を支配すると考えられる。1つはprotonの担体となる膜内の水の濃度・膜内の含水状態であり、もう1つは水和protonの膜内移動（拡散）やproton wireに関わる水分子の再配向といった膜内の動的状態である。この2つの因子に着目して、古細菌モデル糖脂質膜のproton低透過性の原因を考察するため、分枝鎖型脂質と直鎖型脂質の膜内環境を蛍光probe法により比較・検討した²⁰⁾。

まず、含水量に応じて蛍光寿命などが変化するanthroyloxy脂肪酸や*N*-dansyl-phosphatidylethanolamineにより脂質膜内の含水量を比較すると、Mal₃ (Phyt)₂膜では膜表面から膜内にかけて含水量が少ないことが推測された。天然糖脂質DGDGも膜表面近傍の含水量は少なく、前節で述べた糖脂質表面の特徴がここでも見られた。一方、疎水鎖構造がMal₃ (Phyt)₂と同じで、proton透過性も低いDPhPC膜では、直鎖型脂質膜よりも含水量が多く、proton低透過性は含水量の大小とは相関しないと言えた。次に、疎水基にdiphenylhexatriene残基やpyrene残基を持つリン脂質probeを用い、膜内での動的状態（回転拡散、側方拡散）を評価した。結果として直鎖型脂質膜内では運動性が大きいのにに対し、分枝鎖型脂質膜内では運動性が制限されていた。このことから、膜内の運動性の制限の程度がproton低透過性とよりよく相関することがわかった。膜内の運動性の低下はproton伝導に関与する水分子の拡散や再配向運動をも低下させると推測され、結果、proton透過性を抑制すると考えられる。さらに最近、疎水鎖長が同じ直鎖DPPCと分枝鎖DPhPCの二分子膜について分子動力学（MD）計算を進めているが、DPhPC膜では脂質分子の側方間距離が大きいため、膜内への水の浸透が直鎖型脂質膜より大きいという、上記の結果を支持する結果が得られている²²⁾。また疎水鎖領域で水分子が入り得る空隙の分布が、直鎖型脂質膜では連続しているのにに対し、分枝鎖型脂質膜では離散的に存在することも見出された²²⁾。この結果は、分枝鎖型脂質膜の場合、proton wire機構で重要な水分子間の鎖状配列の分断を意味し、この機構による透過確率が低下することを示唆するものである。膜内の動的状態に加えて、こ

Fig. 4 Effects of lipid on the relative oxygen-evolving activity of PS2 reconstituted into vesicle membranes at 40°C. 100% activity of oxygen-evolving activity was 1900 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chla hr}$. Taken from Ref. 26).

Fig. 5 Schematic representation of an artificial energy-conversion membrane system consisting of various functional membrane proteins involved in generation or consumption of the transmembrane proton motive force (PMF), and modeled archaeal glycolipid membranes. PQ: plastoquinone (an intrinsic electron acceptor from PS2 in thylakoid membranes). PMF can be consumed by ATP synthase to synthesize ATP, or various voltage-gated ion channels (or transporters) to translocate various solutes across a membrane. The basal membranes with saccharide moieties and low proton permeability may stabilize the protein structure as well as prolong PMF.

のような膜内の微視的構造の差異も、古細菌モデル糖脂質膜のproton低透過性に寄与していると考えられる。

4. 古細菌モデル糖脂質のバイオテクノロジー分野への応用

前述のように、光合成膜やミトコンドリア膜などのエネルギー変換膜が形成するPMFは、ATP産生などの原動力として重要な因子である。このPMFを人工膜系で発現させ、かつ効率的に利用する上で、非特異的なproton leakの少ない古細菌モデル糖脂質膜は望ましい材料であると期待される。さらに蛋白質を変性させにくい糖鎖層環境をも提供することにより、膜内に埋包した各種膜蛋白質の構造や機能の安定化も期待される。以下で

は膜蛋白質の再構成膜基材としての応用例を示す。

4.1 Proton pumpの再構成

高度好塩古細菌*Halobacterium salinarium* S9由来のbacteriorhodopsin (bR) は、受光することによりprotonを一方向的に輸送し、その結果PMFを形成するproton pumpである²³⁾。Mal₃(Phyt)₂あるいはEPCと荷電性硫糖脂質sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) およびbRを混合し、界面活性剤octylglucoside (OG) により可溶化して透析を行うと、bRはinside-out型にベシクル膜内に再構成される。生成した再構成ベシクルは光駆動的にprotonをベシクル内水相に蓄積し、膜を隔てたpH勾配を形成した。光照射を停止するとproton透過によるpH勾配の減衰が観察されるが、その半減期は、

Mal₃ (Phyt)₂膜の場合、EPC膜に比べ1桁近く長いことが認められた²⁴⁾。この結果は古細菌モデル糖脂質膜のproton低透過性を如実に反映しており、人工膜系でPMFの効率的利用を実現するのに、古細菌モデル糖脂質は適切な膜基材であることを示している。

4.2 光化学系2蛋白質の再構成

ラン藻や高等植物のチラコイド膜に局在する光化学系2蛋白質 (PS2) は、光エネルギーにより水を分解し、分子状酸素・proton・電子を生成する膜蛋白質であり、この光化学反応の過程においてもPMFが生成する²⁵⁾。またPS2は15以上のsubunitから成り、容易に水分解活性を失う不安定な蛋白質である²⁵⁾。好熱性ラン藻*Synechococcus elongatus*チラコイド膜由来のPS2を用い、bRの場合と同じくOG可溶化透析法によりベシクル膜内への再構成を試みた²⁶⁾。この方法によりほぼ定量的にPS2がベシクル膜に組み込まれ、また、例えばMal₃ (Phyt)₂/SQDG (9:1, mol/mol) ベシクル、EPC/SQDG (9:1, mol/mol) ベシクルでは、形態的に殆ど差異のない状態でPS2が組み込まれることが、凍結切断電顕観察より確認された。しかし光駆動型水分解 (酸素発生) 活性については、Mal₃ (Phyt)₂ベシクルの場合、EPCベシクルに比べ約6倍の活性を保持していた。また他の直鎖型リン脂質でもEPCと同程度の活性しか認められなかった (Fig.4)。興味深いことに、Mal₃ (Phyt)₂と同じ疎水鎖を有するDPhPCも、EPCと同程度の活性保持能しか示さなかった。この結果は、PS2の活性維持には、疎水鎖部分の構造よりむしろ極性基の構造 (糖鎖層の存在) が重要であることを示唆している。その安定化機構の解明には、なお今後の検討を要するが、糖や糖アルコールなどによる蛋白質構造の安定化機構^{27, 28)}と類似の機構であろうと推測している。いずれにせよ、PS2の機能的再構成には、汎用リン脂質よりも古細菌モデル糖脂質の方が優れていると結論できる。なおこの結果は、酸素発生型光合成を行うチラコイド膜脂質がリン脂質でなく専ら糖脂質である事実との関連で興味深いものである。

5. おわりに

上記で紹介した古細菌モデル糖脂質は、*T_m*が高いため使い難いとされてきた従来の糖脂質の難点を低減した新しい糖脂質である。膜形成、コロイド安定性、膜透過性、膜内環境という特性を示しつつ、機能性膜蛋白質の再構成例を紹介した。本稿で扱った膜蛋白質は限られたもので、ただちに普遍化できる段階ではないが、これまで常用されてきたリン脂質以上に膜蛋白質活性維持能を有する事実、およびproton低透過性や安定性など膜の物理的性質の観点から、例えばFig. 5に示すような、PMFを生成したりPMFを他のエネルギーに変換するなどの膜蛋白質群を組み込んだ、効率的で微少なバイオリアクタやセンサなどの構築が可能と考えられる。さらに膜蛋白質の構造を変性させ難いと期待されるところから、膜蛋白質の二次元・三次元結晶化マトリックスとしての展開も期待されよう。

謝 辞

本研究の殆どは、旧通商産業省工業技術院・産業科学技術研究開発制度 (機能性蛋白質集合体応用技術研究開発) のもと、旧物質工学工業技術研究所 (現産業技術総合研究所) 羽藤正勝博士、南川博之博士他、旧高分子界面工学研究室の方々との共同研究の成果である。またbR提供は北海道大学・加茂直樹教授、蛍光寿命測定は京都大学・半田哲郎教授、PS2提供は (株) 東レリサーチセンター・元木章裕博士、平野昌彦博士、電顕観察は産業技術総合研究所・周徳山博士、川崎一則博士のご協力を得た。以上の方々に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 古賀洋介, 亀倉正博: 「古細菌の生物学」, 東京大学出版会 (1998)
- 2) Gambacorta A, Gliozzi A, De Rosa M: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11** 115-131 (1995)
- 3) Van de Vossenberg JLCM, Driessen AJM, Konings WN: *Extremophiles* **2** 163-170 (1998)

- 4) Hanford MJ, Peeples TL: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **97** 45-62 (2002)
- 5) Patel GB, Sprott GD: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **19** 317-357 (1999)
- 6) Lindsey H, Petersen NO, Chan SI: *Biochim. Biophys. Acta*, **555** 147-167 (1979)
- 7) Yamauchi K, Doi K, Yoshida Y, Kinoshita M: *Biochim. Biophys. Acta*, **1146** 178-182 (1993)
- 8) Dannenmuller O, Arakawa K, Eguchi T, Kakinuma K, Blanc S, Albrecht AM, Schumtz M, Nakatani Y, Ourisson G: *Chem. Eur. J.*, **6** 645-654 (2000)
- 9) Hato M, Minamikawa H, Tamada K, Baba T, Tanabe Y: *Adv. Colloid Interface Sci.*, **80** 233-270 (1999)
- 10) Hinz HJ, Kutenreich H, Meyer R, Renner M, Fründ R, Koynova R, Boyanov AI, Tenchov BG: *Biochemistry*, **30** 5125-5138 (1991)
- 11) Maggio B, Ariga T, Sturtevant JM, Yu RK: *Biochemistry*, **24** 1084-1092 (1985)
- 12) Baba T, Zheng LQ, Minamikawa H, Hato M: *J. Colloid Interface Sci.*, **223** 235-243 (2000)
- 13) Marinova KG, Alargova RG, Denkov ND, Velez OD, Petsev DN, Ivanov IB, Borwankar RP: *Langmuir*, **12** 2045-2051 (1996)
- 14) Doppert HL, Staverman AJ: *J. Polym. Sci., A-1*, **4** 2367-2372 (1966)
- 15) Verwey EJ, Overbeek JThG: "Theory of Stability of Lyophobic Colloid", Elsevier, Amsterdam (1948)
- 16) Inoue T, Minami H, Shimozawa R, Sugihara G: *J. Colloid Interface Sci.*, **152** 493-506 (1992)
- 17) Korchowiec BM, Baba T, Minamikawa H, Hato M: *Langmuir*, **17** 1853-1859 (2001)
- 18) McDaniel RV: *Biochim. Biophys. Acta*, **940** 158-164 (1988)
- 19) Baba T, Toshima Y, Minamikawa H, Hato M, Suzuki K, Kamo N: *Biochim. Biophys. Acta*, **1421** 91-102 (1999)
- 20) Baba T, Minamikawa H, Hato M, Handa T: *Biophys. J.*, **81** 3377-3386 (2001)
- 21) Paula S, Volkov G, van Hoek N, Haines TH, Deamer DW: *Biophys. J.*, **70** 339-348 (1996)
- 22) 篠田 渉, 三上益弘, 馬場照彦, 羽藤正勝: 日本生物物理学会第40回年会講演要旨集, IG0930 (2002)
- 23) Stoeckenius W, Lozier RH, Bogomolni RA: *Biochim. Biophys. Acta*, **505** 215-278 (1979)
- 24) 羽藤正勝他: 「機能性蛋白質集合体応用技術研究開発総括報告書」, バイオテクノロジー開発技術研究組合編, 95-113 (1999)
- 25) Hankamer B, Barber J, Boekema E: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48** 641-671 (1997)
- 26) Baba T, Minamikawa H, Hato M, Motoki A, Hirano M, Zhou D, Kawasaki K: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265** 734-738 (1999)
- 27) Arakawa T, Timasheff SN: *Biochemistry*, **24** 6536-6544 (1982)
- 28) Williams WP, Gounaris K: *Biochim. Biophys. Acta*, **1100** 92-97 (1992)

(受付 2002年9月1日 掲載決定 9月14日)