

氏名	ばばてるひこ 馬場 照彦
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第 657 号
学位授与の日付	平成 13 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Studies on Physicochemical Properties of Novel Phytanyl-Chained Glycolipid Bilayer Membranes and Their Biotechnological Application (新規フィタニル鎖型糖脂質二分子膜の物理化学的性質とその生物工学的応用に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 半田 哲郎 教授 中川 照真 教授 多賀 徹

### 論文内容の要旨

古細菌脂質をモデルとして新規に開発されたフィタニル鎖型ジエーテル糖脂質群は糖鎖の立体化学が規制され、化学的に安定で、かつゲル液晶相転移温度が 0℃以下の糖脂質群である。著者は、この新規糖脂質群の膜形成、膜間相互作用、膜透過性を評価し、これまで生物工学分野等で汎用されているリン脂質膜との差異を明らかにするとともに、光合成膜蛋白質を用いたエネルギー産生膜を構築する膜基材としての有用性についても評価を行った。

#### 第 I 章 新規フィタニル鎖型糖脂質の膜形成と膜間相互作用

マルトオリゴ糖鎖を有するフィタニル鎖型糖脂質群、1,3-ジ-O-フィタニル-2-O-(β-グリコシル)グリセロール (Glc(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>N</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, (N=2, 3, 5)), 図 1 は、糖鎖長に応じて水中での自己集合構造が変化する。すなわち、糖鎖長が短い Glc(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>2</sub>(Phyt)<sub>2</sub> は、逆ヘキサゴナル構造を形成し、糖鎖長が長い Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>5</sub>(Phyt)<sub>2</sub> はラメラ構造を形成する。

ラメラ形成性脂質 Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> は、水中では容易にベシクル膜を形成する。しかし、卵黄ホスファチジルコリン (EPC) ベシクルとは異なり、低 pH や塩を含む緩衝液中では脂質分散性が大きく低下した。この現象を明らかにする目的で、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> で形成した大きな一枚膜ベシクルを用い、分散性に対する pH と塩濃度の影響を検討した。

その結果、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクルは低 pH 領域で凝集し、高 pH 領域で脱凝集する可逆的 pH 依存凝集を示すことが明らかになった。また凝集閾 pH 値は、NaCl 濃度の増大とともに増大した。電気泳動移動度測定から、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクルは pH 2—13 の範囲で負に帯電していることが明らかとなった。この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 理論により、pH 依存凝集が明快に説明された。一方、表面力直接測定法により、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜の分

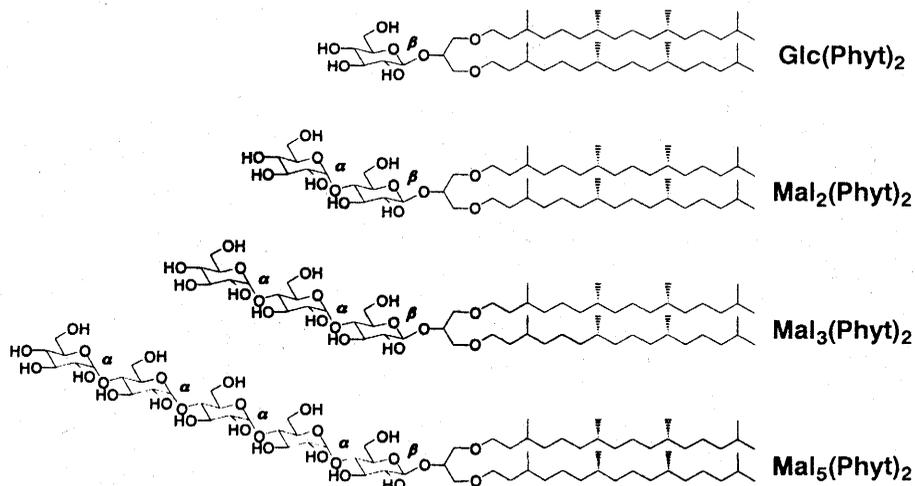


図 1 フィタニル鎖型糖脂質群 (Glc(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>N</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, (N = 2, 3, 5)) の化学構造式

散安定性には EPC ベシクルで考えられている短距離斥力、いわゆる「水和力」の寄与は小さいことが推測された。すなわち、糖脂質ベシクル分散系の安定性には、長距離斥力である静電力が主要因子として作用することが結論づけられた。

## 第 II 章 新規フィタニル鎖型糖脂質の膜透過特性と膜内環境

本章では、新規フィタニル鎖型糖脂質の膜透過性、特にプロトン透過性と、その透過性を支配すると考えられる膜内部の極性および動的性質について論じる。

フィタニル鎖型糖脂質の膜透過性は、平面膜および pH 感受性蛍光プローブ内封ベシクル膜により検討した。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 平面膜のコンダクタンスは大豆リン脂質膜の 1/6~1/4, Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜のプロトン透過性は EPC 膜の 1/10~1/4 程度と、いずれもフィタニル鎖型糖脂質膜のプロトン透過性が低いことが示された。また Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> の耐電圧性は、大豆リン脂質膜より高く、経時的な膜の耐久性も高いことが観察された。しかし、疎水鎖構造が Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> と類似したリン脂質、ジフィタノイルホスファチジルコリン (DPhPC) 膜では Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜と同程度の膜透過性、膜安定性が観測された。

さらにフィタニル鎖型糖脂質膜の低透過性を考察するため、膜内含水量、脂質の回転拡散、および側方拡散を各種蛍光プローブ法により評価した。ベシクル膜内の含水量は、脂質グリセロール骨格付近から二分子膜中央付近に向かい低下するが、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜では、グリセロール骨格付近における含水量が、検討した脂質の中で最も低く、プロトン担体としての水分子が最少であると推測された。しかし、疎水鎖構造が類似の DPhPC 膜では、グリセロール骨格付近の含水量が高く、膜内含水量だけでは膜透過性は理解できない。脂質の回転拡散や側方拡散のような動的性質評価により、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, DPhPC 膜内部の分子運動が制限されていることが示された。このことが水の膜内拡散に伴うプロトン膜透過性を低下させる主因であると考えられた。

以上の知見は、新規フィタニル鎖型糖脂質ベシクル膜が、エネルギー産生膜蛋白質の形成するプロトン濃度勾配を効率的に利用する上で、望ましい膜基材であることを示唆している

## 第 III 章 新規フィタニル鎖型糖脂質二分子膜の生物工学的応用

本章では、受光してプロトン駆動力を生じるエネルギー産生膜蛋白質、すなわち光合成膜蛋白質をフィタニル鎖型糖脂質と複合化・再構成する方法、および膜蛋白質機能の発現について論じる。

光合成膜蛋白質が存在するチラコイド膜では、高い組成の糖脂質がその活性を支えていると考えられている。そのためフィタニル鎖型糖脂質膜は糖鎖環境を提供できる新規糖脂質として合理的であると考えられる。

まず光合成膜蛋白質である高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* 由来バクテリオロドプシン (bR) を用いて検証を行った。bR の Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜内への組み込みは界面活性剤オクチルグルコシド (OG) による可溶性透析法を適用し、光照射によりプロトンポンプ活性を示す bR 再構成ベシクル膜を調製した。この再構成系における bR の膜内配向は、EPC ベシクル膜と同様、inside-Out 型であった。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜の低プロトン透過性は bR 再構成系でも再現され、膜を隔てた pH 勾配が EPC ベシクル膜より長時間維持されることが示された。

次に好熱性ラン藻 *Synechococcus elongatus* チラコイド膜由来光化学系 II 蛋白質集合体 (PS II) を用いて検証した。脂質ベシクル膜への PS II の再構成も OG 可溶性透析法によった。ベシクル膜への PS II の組み込み状態は、リン脂質と Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> では差異がないことが、凍結切断電顕観察から示された。しかし、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜中の PS II は、リン脂質 (EPC, DPhPC) ベシクル膜中に比べ約 6 倍の水分解活性を示し、新規糖脂質が不安定な膜蛋白質の安定な組み込みに有利であることが示唆された。

以上、新規に開発したフィタニル鎖型糖脂質について、その膜形成、分散安定性、膜透過性、膜内の微視的環境を界面化学的および分光学的手法を用いて評価し、さらに、膜蛋白質の再構成マトリックスとしての有用性を、bR や光化学系 II 蛋白質集合体のような複雑で不安定な膜蛋白質を用いて明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

古細菌脂質をモデルとして新規に開発されたフィタニル鎖型ジエーテル糖脂質群は糖鎖の立体化学が規制され、化学的に安定で、かつゲル液晶相転移温度が 0 °C 以下の糖脂質群である。著者は、この新規糖脂質群の膜形成、膜間相互作用、膜透

過性を評価し、これまで生物工学分野等で汎用されているリン脂質膜との差異を明らかにするとともに、光合成膜蛋白質を用いたエネルギー産生膜を構築する膜基材としての有用性についても評価を行った。

### 第1章 新規フィタニル鎖型糖脂質の膜形成と膜間相互作用

マルトオリゴ糖鎖を有するフィタニル鎖型糖脂質群、1,3-ジ-O-フィタニル-2-O-(β-グリコシル)グリセロール (Glc(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>N</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, (N=2, 3, 5) は、糖鎖長に応じて水中での自己集合構造が変化するが、糖鎖長が長い Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub>, Mal<sub>5</sub>(Phyt)<sub>2</sub> はラメラ構造やベシクル膜を形成する。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜は卵黄ホスファチジルコリン (EPC) ベシクルとは異なり、低 pH 領域で凝集し、高 pH 領域で脱凝集する可逆的 pH 依存凝集を示し、その凝集閾 pH 値は、NaCl 濃度の増大とともに増大した。電気泳動移動度測定から、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクルは pH 2—13 の範囲で負に帯電していることが明らかとなった。この帯電に伴う静電斥力と van der Waals 引力を考慮した古典的 DLVO 理論により、pH 依存凝集が明快に説明された。一方、表面力直接測定法により、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜の分散安定性には EPC ベシクルで考えられている短距離斥力、いわゆる「水和力」の寄与が小さいと推測された。すなわち、糖脂質ベシクル分散系の安定性には、長距離斥力である静電斥力が主要因子として作用すると結論づけられた。

### 第2章 新規フィタニル鎖型糖脂質の膜透過特性と膜内環境

フィタニル鎖型糖脂質の膜透過性は、平面膜および pH 感受性蛍光プローブ内封ベシクル膜により検討した。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜はコンダクタンスもプロトン透過性も大豆リン脂質や EPC 膜の 1/10—1/4 程度と低いことが明らかにされた。しかし、疎水鎖構造が Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> と類似したリン脂質、ジフィタノイルホスファチジルコリン (DPhPC) 膜でも Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜と同程度の膜透過性、膜安定性が観測された。そこで、膜内含水量と膜脂質分子の動的性質を各種蛍光プローブ法により評価した。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 膜ではグリセロール骨格付近の含水量が検討した脂質の中で最も低く、プロトン担体としての水分子が最少であると推測された。しかし、疎水鎖構造が類似の DPhPC 膜ではグリセロール骨格付近の含水量が高く、膜内含水量だけでは膜透過性は説明できないことがわかった。一方、回転拡散や側方拡散のような動的性質評価により、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> や DPhPC 膜内部で脂質の分子運動が制限されていることが示され、このことが水の膜内拡散に基づくプロトン透過性を低下させる主因であると結論された。

### 第3章 新規フィタニル鎖型糖脂質二分子膜の生物工学的応用

光合成膜蛋白質が存在するチラコイド膜では、糖脂質がその活性を支えているが、フィタニル鎖型糖脂質は合理的糖鎖環境を提供できる新規糖脂質と考えられる。まず光合成膜蛋白質である高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* 由来バクテリオロドプシン (bR) を Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> 2 分子膜内に再構成し、活性な光照射プロトンポンプベシクルを調製した。この再構成系における bR の膜内配向は、EPC ベシクル膜と同様で、inside-out 型であった。Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜ではその低プロトン透過性により、光照射で生成した膜 pH 勾配が EPC ベシクル膜より長時間維持されることが示された。

次に好熱性ラン藻 *Synechococcus elongatus* チラコイド膜由来光化学系 II 蛋白質集合体 (PS II) を脂質ベシクル膜に再構成した。ベシクル膜への PS II の組み込み状態はリン脂質と Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> で差異はないが、Mal<sub>3</sub>(Phyt)<sub>2</sub> ベシクル膜中の PS II はリン脂質 (EPC, DPhPC) ベシクル膜中に比べ約 6 倍の水分分解活性を示し、新規糖脂質が不安定な膜蛋白質の安定な組み込みに有利であることが示唆された。

以上、新規に開発したフィタニル鎖型糖脂質について、その膜形成、分散安定性、膜透過性、膜内の微視的環境を界面化学的および分光学的手法を用いて評価し、さらに、膜蛋白質の再構成マトリックスとしての有用性を、bR や光化学系 II のような複雑で不安定な膜蛋白質集合体を用いて明らかにした。これらの知見は、エネルギー産生膜蛋白質の形成するプロトン濃度勾配を効率的に利用する上で、新規フィタニル鎖型糖脂質ベシクル膜が望ましい膜基材であることを示している。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に平成13年8月31日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。