

## モデル膜貫通ヘリックスを用いた膜タンパク質フォールディングに関する基礎的研究

矢野 義明

## Fundamental Studies on Membrane Protein Folding Using Model Transmembrane Helices

Yoshiaki YANO

Department of Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,  
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received June 2, 2005)

To understand the folding process of  $\alpha$ -helical membrane proteins in a lipid bilayer environment, the mechanisms of membrane partitioning and self-association of the helix should be elucidated. Considering the inhomogeneity of biological membranes composed of various lipids, not only the amino acid sequence of the transmembrane helices but also the composition of the lipid bilayers are determinants for folding and intramembrane distribution of membrane proteins through the balance between helix-helix, helix-lipid, and lipid-lipid interactions. Thermodynamic study using model transmembrane helices is fascinating to measure these complex interactions experimentally. The effects of lipid composition on membrane partitioning and self-association of an inert model transmembrane helix, (AALALAA)<sub>3</sub>, were examined. Partitioning of the helix into phosphoethanolamine-containing bilayers, gel-phase bilayers, or liquid ordered-phase bilayers significantly decreased, presumably by decreasing the fluidity in the hydrophobic region of the bilayer. It was found that the difference in the length of the hydrophobic regions between helix and lipid bilayers is energetically unfavorable, and partitioning into thicker and thinner membranes were weakened by increasing enthalpic and entropic terms, respectively. In contrast, stronger helix associations driven by the decrease in enthalpy were observed with increasing membrane thickness. These results demonstrate that the surrounding lipids are also important factors determining the behavior of transmembrane helices.

**Key words**—model transmembrane helix; membrane protein folding; hydrophobic mismatch; helix-helix interaction; helix macrodipole

## 1. はじめに

細胞やオルガネラの内と外を区切るバリアとなっている生体膜には、多数のタンパク質が埋まっており、多種多様なリガンドが引き起こす生体シグナルの窓口として、あるいは物質輸送の関門として重要な役割を担っている。膜タンパク質は、水溶性タンパク質と同様にリボソームで合成されるが、合成中あるいは合成後に膜環境に移行し、各々のアミノ酸配列に応じた膜貫通トポロジーを取り、最終的なフォールディングを達成する。膜中での静電相互作用は水中の約 40 倍強く、また疎水性相互作用が存在しないことから、膜タンパク質の構造形成原理は水

溶性タンパクのそれと大きく異なると予想される。そればかりでなく、生体膜環境は多種多様な脂質分子からなり、しかも近年注目されている脂質マイクロドメイン（ラフト）のように、不均一な多相系として存在し得るという点で、水相環境とは全く異なる様相を呈する。例えば、タンパク質間の相互作用が新たなタンパク質-脂質間相互作用を生み、不均一ドメイン形成を誘起したり、逆にドメイン形成により他のタンパク質の局在が変化したりする可能性があるが、その一般原理はほとんど不明である。膜厚などの膜物性の変化が膜タンパク質の活性に影響することはよく知られているが、どのようなメカニズムでタンパク質の動的構造変化やそれに伴う機能に変化が起こるのかもよく分かっていない。

以上を踏まえて、物理化学的な実験手法で膜タンパク質のフォールディングを調べていくには、アミノ酸配列依存的な膜環境での構造形成の駆動力に加

京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: yyano@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

えて、脂質組成によるタンパク質間、タンパク質-脂質間相互作用の調節のメカニズムを知る必要がある。しかし、膜タンパク質の単離精製は一般に困難な上、水溶性タンパクと異なり、可逆に変性-リフォールディングさせることが難しいことを考えると、複雑な膜タンパク質そのものを用いてフォールディングを研究するのは現実的ではない。また多数の相互作用部位を含む配列では、残基毎の寄与を分離できない。むしろ、膜タンパク質の最小構成単位である膜貫通ヘリックスを形成するモデルペプチドを用いて、フォールディングに寄与する熱力学量を系統的に測定するアプローチが有効なことが明らかになってきている。本稿では、まず膜タンパク質フォールディングのコンセンサスを紹介してそれがヘリックス-脂質間、ヘリックス-ヘリックス間相互作用に分解可能なことを示す。次に実際にデザインした疎水性ペプチドがモデル膜貫通ヘリックスとして有用であることを示すとともに、脂質組成が膜貫通ヘリックスの膜分配や自己会合に及ぼす影響について述べる。

## 2. 膜タンパク質フォールディングのモデル化

ポリペプチド主鎖が水素結合を満たさない状態で水相から膜相へ移行する際に、非常に大きいエネルギーコストがかかるため (20 アミノ酸残基の膜貫通ヘリックスで約 500 kJ/mol)、膜中でペプチド主鎖は通常分子内水素結合を満たし、多くの場合膜貫通ヘリックスを形成する。<sup>1)</sup> 最も疎水性の高いアミノ酸側鎖であってもこのコストを相殺することはできない。そのため多くの膜タンパク質のフォールディングは、膜貫通  $\alpha$ ヘリックス構造を基本骨格として熱力学的に別個の 2つのステージに分離して考慮できる (two-stage model)。すなわち、ステージ

1において個々の疎水性部位が膜を貫通して安定な  $\alpha$ ヘリックスを形成し、次にステージ2においてヘリックス間の相互作用により立体構造を形成するというモデルである (ただし、主鎖の一部の水素結合が乱れたり、水溶性ループ領域があとから膜内へ挿入したりするなどの modification は起こり得る)。<sup>2,3)</sup> 膜タンパク質同士が膜内で会合する場合も、分子間でステージ2に相当する相互作用があると考えればよい。このモデルに従うと、ヘリックスの水-膜相間分配 (ステージ1) 及び膜中におけるヘリックス間相互作用 (ステージ2) を明らかにすることが重要だと言える (Fig. 1)。ただし、生体でのタンパク質合成時における膜貫通領域の膜への挿入 (ステージ1に相当) は、タンパク質透過チャネルであるトランスロコン複合体を介して起こることに注意を払う必要がある。Biologicalな膜への挿入過程は、熱力学的安定性の観点から得られる two-stage model とかならずしも一致するとは限らない。特に重要な知見を2つ挙げる。第1に、ヘリックスの膜への挿入のトポロジーは、挿入する配列とトランスロコンとの相互作用の影響を大きく受けて変わり得る。<sup>4)</sup> したがって疎水性の高くない部位であっても、前後のアミノ酸配列によっては強制的に膜貫通トポロジーを取らされ得る。一度決まったトポロジーは、親水性ループ部位が膜を通過しないため非常に変わりにくい。第2に、トポロジーの制約を考えなくてよいような場合、生体膜を用いて決定された各アミノ酸残基の膜挿入エネルギースケールと biophysicalな疎水性スケールの間には荒くはあるがかなりの相関がある。<sup>5)</sup> したがって、biophysicalな測定から求められる膜分配スケールは生体でのヘリックスの膜挿入を知る上で重要な手掛かりに

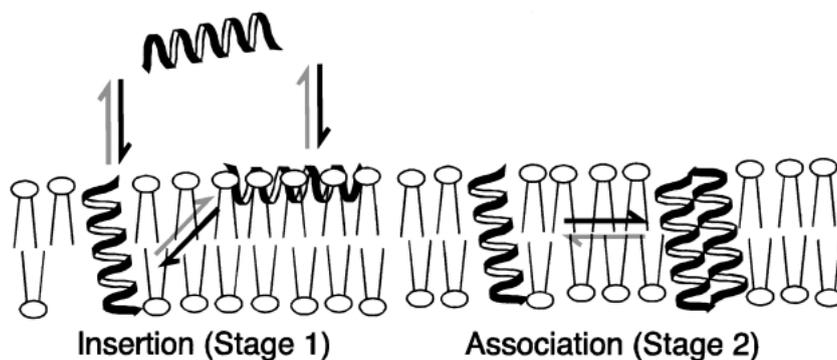


Fig. 1. Two-stage Model for the Folding of an  $\alpha$ -Helical Membrane Protein

なる。現在のところ、脂質二分子膜系で膜貫通ヘリックスを用いてアミノ酸疎水性スケールを直接的に測定した例はなく、今後の展開が期待される。

膜中でのヘリックス-ヘリックス間相互作用は、膜タンパク質フォールディングの中核をなしている。この段階の自由エネルギー変化  $\Delta G_a$  を、さらに複数の項に分けて解釈することができる。<sup>1)</sup> 安定な二次構造をとっているタンパク質の表面は液晶状態の膜疎水部の脂質アシル鎖に比べ柔軟性に乏しい。このため一般にタンパク質周りの脂質(周辺脂質)がタンパク質の表面に形を合わせ、運動性が制限される。Figure 2のように、ヘリックスの会合(ヘリックス間相互作用  $\Delta G_{HH}$  の増加)に伴い、周辺脂質の一部が取り除かれ(ヘリックス-脂質間相互作用  $\Delta G_{HL}$  の減少)、バルクの脂質に変化する(脂質間相互作用  $\Delta G_{LL}$  の増加)と考えることができる。また後述するヘリックスの異なる膜間の移行自由エネルギー変化も、異なる脂質膜間での  $\Delta G_{HL}$  及び  $\Delta G_{LL}$  の差として考慮することができる。

アミノ酸配列の影響を見積もるためには、ホスト-ゲストアプローチを用いる。適当なモデル膜貫通ヘリックスをホストペプチドとして採用し、そこにゲストの残基や配列を導入することにより一連のモデルペプチドを作成して、膜構成脂質を変化させ系統的に自由エネルギーを測定すればよい。

### 3. ホストペプチドのデザイン

ヘリックス-脂質間、ヘリックス間相互作用を研究するためのホストペプチドとしては、安定な膜貫通ヘリックスを形成し、なおかつ特異的な相互作用

をなるべく持たないような inert な配列にする必要がある。この観点からするとこれまでに報告されているモデル膜貫通ヘリックスの大部分で採用されている、ヘリックス両端のアンカリング残基(リジンなどの親水性残基や、トリプトファンなど膜界面に分配し易いことが知られている残基)を持たない方が好ましい。またポリロイシン配列はロイシンジッパーモチーフ<sup>6)</sup>による会合が予想されるため不適当である。筆者らのように heptad repeat 中でロイシンジッパーを形成しないような配列にする(Fig. 3)、あるいは Killian らの KALP, WALP ペプチド<sup>7)</sup>のように heptad repeat にならないようロイシンとアラニンを交互に並べる、などの注意がある。ポリアラニン配列では膜貫通に必要な疎水性が十分ではなく、少なくとも 1/4 程度がロイシンで置き換わっている必要がある。一残基当たりのヘリックス長は約 1.5 Å で、20 残基程度で代表的なリン脂質であるパルミトイルオレオイルフォスファチジルコリン(C16:0/C18:1PC)脂質二分子膜の疎水部の厚さ(約 27 Å)に相当する。以上を踏まえて、考え得る限り inert な新規モデルペプチドをデザインした(Fig. 3)。疎水性側鎖の中でも、特にヘリックス形成能が高いことで知られるロイシンやアラニンを膜貫通領域のベースの残基として選んだが、ほかの疎水性側鎖(イソロイシン、バリンなど)を用いた時に、膜貫通ヘリックスの性質にどのような変化が出るのかも興味深く、今後の課題である。

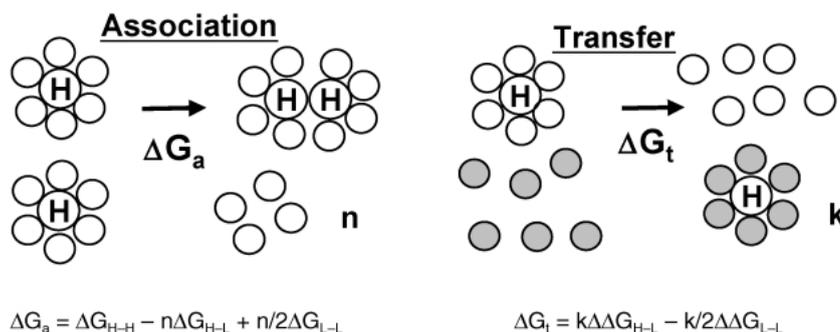


Fig. 2. Separation of Helix-Helix Interaction from Helix-Lipid and Lipid-Lipid Interactions

The formation of a new helix-helix contact in lipid bilayers is associated with changes in helix-helix, helix-lipid, and lipid-lipid interactions. In a lattice like model,  $n$  lipids were removed from proximity of the helix to bulk lipids to form  $n/2$  lipid-lipid interactions,  $\Delta G_a = \Delta G_{HH} - n\Delta G_{HL} + n/2\Delta G_{LL}$  (1). Considering the difference between membrane X and Y,  $\Delta\Delta G_a = \Delta\Delta G_{HH} - n\Delta\Delta G_{HL} + n/2\Delta\Delta G_{LL}$  (2). On the other hand, transfer free energies  $\Delta G_t$  from membrane X to Y can be described by the difference in helix-lipid and lipid-lipid interactions between membranes,  $\Delta G_t = k\Delta\Delta G_{HL} - k/2\Delta\Delta G_{LL}$  (3). Thus, the  $\Delta\Delta G_{HH}$  term can be extracted from the measured  $\Delta G_a$  and  $\Delta G_t$  values,  $\Delta\Delta G_{HH} = \Delta\Delta G_a + k/n\Delta G_t$  (4). Because of the radii of the helix (5 Å) and the lipid (4.7 Å) at the bilayer plane are similar, hexagonal packing between the helices and the lipids can be assumed.

$K_2GL_9WL_9K_2A$  Lew et al. (2000)  
 $GW_2(LA)_9LW_2A$  de Planque et al. (2001)

- (I) NBD-(LALAAAA)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>  
 (II) Rhodamine-(LALAAAA)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>  
 (III) NBD-(AALALAA)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>  
 (IV) Ac-(AALALAA)<sub>3</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-DABMI

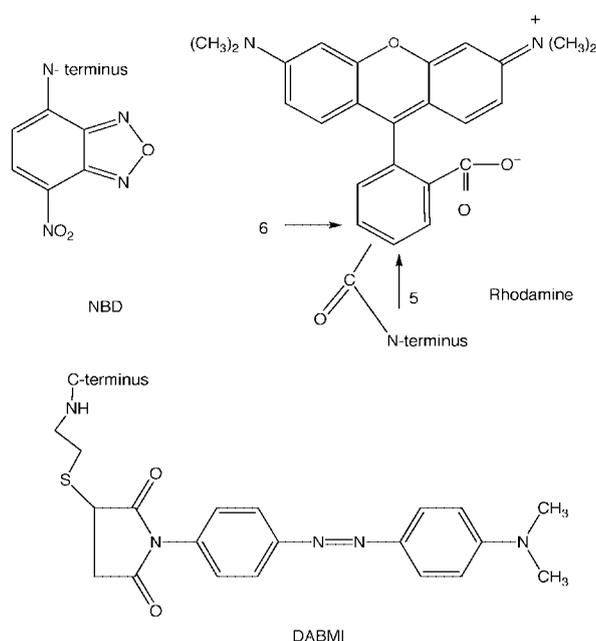


Fig. 3. Design of Model Transmembrane Helices

#### 4. ホストペプチドの脂質二分子膜内での基本的挙動

脂質二分子膜中でのペプチドの二次構造と膜に対する配向は、Ge 結晶上に調製した配向多重膜を用いて、偏光一赤外全反射吸収スペクトル測定から得た。<sup>8)</sup> ペプチド由来のアミド吸収帯の解析から、このペプチドは C16 : 0/C18 : 1PC 二分子膜中において膜貫通配向を取ることが分かった。また、大きな1枚膜ベシクル (LUV) に組み込んだ (I) の N 末端ラベル蛍光色素 NBD のジチオナイトによる消光実験から、このヘリックスの半分は N 末端がベシクルの内側に向き、残り半分は外側に向けた膜貫通トポロジーを持っていることが明らかになり、両端に膜界面へのアンカーとなる親水性や芳香族の残基を持たないにも関わらず安定なトポロジーを持つ膜貫通ヘリックスを形成することを示した。<sup>8)</sup> 膜貫通ヘリックスの会合を調べる手法としては、システインや架橋剤によるクロスリンクを利用した方法<sup>9,10)</sup>

もあるが、今のところ最も高い精度が期待できるのは、サンプルを破壊せずに会合を測定可能な、蛍光励起エネルギー移動 (FRET) を利用する方法である。このヘリックスは C16 : 0/C18 : 1PC 膜中で単量体一逆平行型 2 量体間平衡にあり、(I) から (II) への FRET を利用してその会合自由エネルギー ( $\Delta G_a$ ) が約  $-13$  kJ/mol であることを明らかにした。またスピンドラベル脂質を用いて、このヘリックスの周囲に運動性の制限された脂質が存在することを示した。

ヘリックスの水相から膜相への挿入、あるいは膜からの解離過程も、膜タンパク質フォールディングの解明に重要な過程である。今回用いたペプチドの水相への溶解性は非常に低く、その濃度を直接測定することはできなかったが、C16 : 0/C18 : 1PC からなるドナーリポソーム中で Rhodamine ラベル脂質により消光されている (I) の NBD 蛍光が、Rhodamine ラベル脂質を含まないアクセプターリポソームに移動した際に回復することを利用し (Fig. 4), このヘリックスが非常にゆっくりとした速度で膜から水相へ解離し、再び膜挿入する性質を持つことを実証した。<sup>11)</sup> Rhodamine ラベル脂質自体はベシクル間を全く移行しない。また、移行速度はベシクル濃度に依存しなかったため、ベシクル間衝突の際にペプチドが乗り移っているのではないことが確認できた。また、移行のキネティクスは一次速度式に従ったため、膜内の大部分のフラクションであるモノマーが水相へ解離していると考えられる。膜間移行の速度定数はヘリックスの膜からの解離過程を示しており、移行速度定数の温度依存性から解離の活性化エネルギーを世界で初めて測定 ( $+74.3$  kJ/mol) することができた。また、ヘリックスが膜へ挿入する際に、膜電位とヘリックス由来のマクロ双極子 (N 末端, C 末端の  $0.5e$  程度の部分電荷に相当) との相互作用により、挿入のトポロジーが大きく影響を受けることを示した。約  $100$  mV の電位をかけることでヘリックスの約  $85\%$  が膜電位を打ち消すトポロジーで挿入した。膜貫通ヘリックス配向を制御する手法としての応用が考えられる。

#### 5. 脂質組成によるヘリックス分配, 会合の Modulation

##### 5-1. 脂質頭部, アシル鎖飽和度, 相の影響

上述のヘリックスのベシクル間移動の実験系で、ド

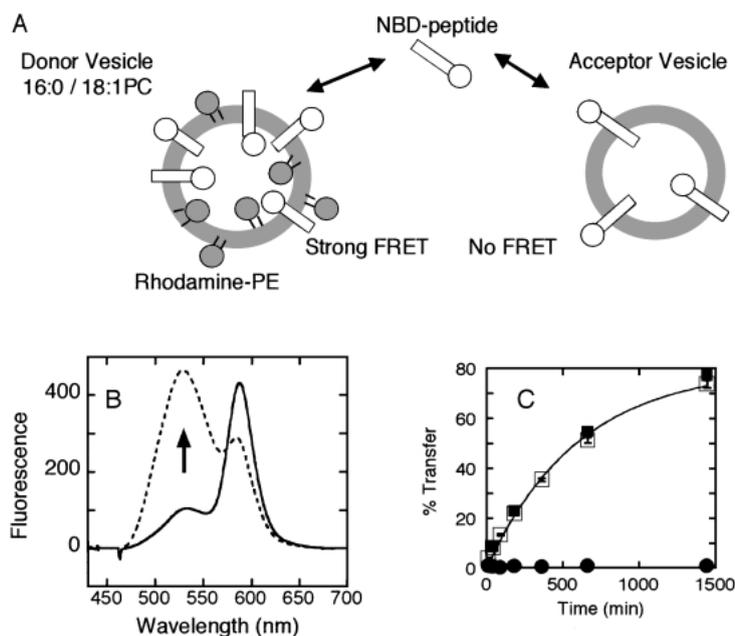


Fig. 4. Interspersed Transfer of the Helix

(A) The helix transfer kinetics was monitored by fluorescence recovery of the quenched peptide in donor vesicles containing a quencher upon its transfer to acceptor vesicles without the quencher. (B) FRET from NBD to Rhodamine for measuring the kinetics of II transfer between 16 : 0/18 : 1 PC vesicles. Donor POPC vesicles (200  $\mu$ M) containing 0.5 mol% II and 1 mol% Rhodamine-PE were mixed with an excess of acceptor vesicles (1 mM) in 10 mM Tris/150 mM NaCl buffer (pH 7.4) at 25  $^{\circ}$ C. Emission spectra before (solid line) and after (broken line) 24 h incubation are shown. The arrow indicates recovery of NBD fluorescence due to transfer of II to acceptor vesicles. (C) Vesicle concentration-dependence of transfer rate. Donor 16 : 0/18 : 1 PC vesicles were incubated with acceptor vesicles in a donor-to-acceptor ratio of 1/5 at total lipid concentrations of 1.2 mM (closed squares) and 12 mM (open squares). NBD-PE transfer in the presence of unlabeled peptide in the donor vesicles was also examined (closed circles).

ナーベシクルを C16 : 0/C18 : 1 PC に固定し、アクセプターベシクルを様々な脂質組成にして、ヘリックス移行率の平衡値を求めることで、C16 : 0/C18 : 1 PC からアクセプター膜への分配自由エネルギー  $\Delta G_t$  を計測することに成功した。モデル膜貫通ヘリックスとして、上述のものと組成は同じであるが対称な配列に変更したペプチド X-Y [X=NBD, Y=NH<sub>2</sub> (III) or X=Ac, Y=DABMI (IV)] を用いた (Fig. 3)。脂質頭部に負電荷を持つフォスファチジルグリセロール PG やフォスファチジルセリン PS へのヘリックス移行の  $\Delta G_t$  は 0 に近い値を取り、膜表面の負電荷はヘリックス分配に影響しないことが分かった。一方で、脂質頭部が小さく、逆ヘキサゴナル相を形成し易いことで知られるフォスファチジルエタノールアミン PE を含む PC 膜に対しては、PE 含有率に比例して  $\Delta G_t$  は増加した (Fig. 5 (A), 100% の PE に外挿した場合の  $\Delta G_t = +12$  kJ/mol)。脂質二分子膜構造は脂質頭部同士の反発と疎水部の側方圧のバランスによって保たれているため、PE 添加によって疎水部の側方圧が増加し、ヘリックスの膜疎水部への挿入が妨げら

れたと考えられる。また分配の温度依存性から、PE 膜へのペプチドの移行には吸熱を伴うことが分かった (Fig. 5 (B), 約 30% の PE を含む膜への移行で  $\Delta H_t = +14$  kJ/mol)。次に、いずれも液晶相で膜厚がほぼ同じだが、飽和鎖からなる diC (14 : 0) PC と、不飽和鎖からなる diC (16 : 1) PC へのヘリックスの分配を比較したところ、ほぼ同程度で、不飽和鎖の方にわずかに ( $\Delta \Delta G_t = 0-0.6$  kJ/mol 程度) 分配し易かった。また、流動性の低いゲル相にはヘリックスはほとんど移行しなかった。最後に、近年注目を集めている脂質ラフトが形成する相である秩序液体相への分配を調べた。秩序液体相の形成に必要なコレステロールはベシクル間をゆっくり移動するという問題があるため、ベシクル間移動の実験の代わりに、巨大 1 枚膜ベシクル (GUV) を用いてヘリックスの液晶相、秩序液体相への分配を観察した (Fig. 5 (C))。ヘリックスは液晶相へ強く分配し、秩序液体相から排除されることが分かった。ある種の膜貫通型タンパク質はシグナル伝達の際にラフトドメインへ集積すると考えられるが、今回の結果は、通常、パッキングの強い秩序液体相に

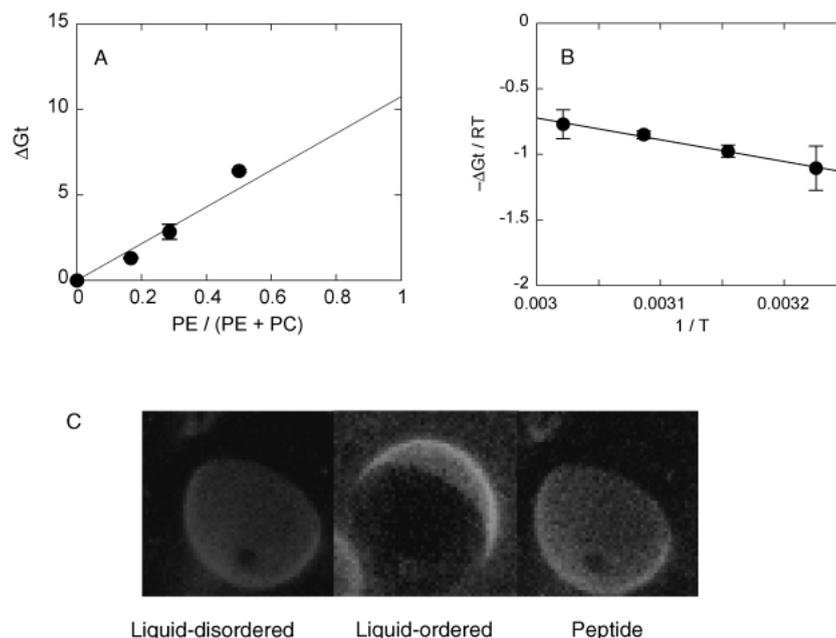


Fig. 5. Lipid Compositional Effects on the Partitioning of the Helix

(A) The effect of incorporation of phosphoethanolamine on the transfer free energy ( $\Delta G_t$ ) of the helix, calculated from the equilibrium values of the transfer. (B) The van't Hoff analysis of the helix transfer to PE/PC=2/5 membranes. (C) The helix partitioning between liquid-disordered and liquid-ordered phases. Confocal fluorescence images of giant unilamellar vesicles composed of diC18 : 1 PC/diC 16 : 0 PC/cholesterol=2/2/1 are shown. To visualize liquid-disordered and liquid-ordered domains, 0.1 mol% of Rhodamine-PE and monosialoganglioside GM1 were incorporated, respectively. GM1 was detected by Alexa Fluor 647 dye-labeled cholera toxin B subunit.

対して、膜貫通ヘリックスは分配し難い性質を持つことを示している。タンパク質のアシル化がラフト分配の駆動力になることが知られているが、膜貫通領域や膜界面領域のアミノ酸配列に依存して相分配が変化する可能性もあり、今後の解明が期待される。

**5-2. 疎水部ミスマッチの影響** オルガネラ間の膜厚の違いが、膜タンパク質の活性及び局在を制御している可能性がある。<sup>12)</sup> また前述のラフトドメインも通常より厚い二分子膜構造を形成すると考えられる。そこで、膜貫通ヘリックスの疎水部の長さと同疎水部の厚さのマッチングに焦点を当て、ヘリックスの自己会合力及び膜への分配が膜厚にどのように影響を受けるかを調べた。膜疎水部の厚さは、不飽和結合を1つ含むアシル鎖を2本持つフォスファチジルコリン (diC (X : 1) PCs, X=14, 16, 18, 20, 22, Xはアシル鎖炭素数) を用いて、20 Å から34 Å まで変化させた。膜厚を変えても膜貫通ヘリックス構造と配向にほとんど変化はなかった。(III) から (IV) への FRET を利用して、このヘリックスの膜中での逆平行型2量体の形成を精度よく測定できた。会合は薄い膜中では弱く (diC (14 : 1) PC で  $\Delta G_a$  は約 -10 kJ/mol)、膜が厚くなるほど強

くなる (diC (22 : 1) PC で  $\Delta G_a$  は約 -20 kJ/mol) 傾向にあった (Fig. 6(A))。また会合の温度依存性から、この会合がエンタルピー駆動であることが分かった。ヘリックスマクロ双極子間引力が主要な駆動力だと考えられた。

C16 : 0/C18 : 1PC から厚さの異なる膜への分配自由エネルギー  $\Delta G_t$  は、C16 : 0/C18 : 1PC をドナーベシクル、diC (X : 1) PCs をアクセプターベシクルとして計測した (Fig. 6(A))。ヘリックス会合とは対照的に、疎水性ミスマッチが存在する場合、すなわち膜厚がヘリックス長より薄過ぎる、あるいは厚過ぎる場合に、ヘリックスの膜への分配は減少した (diC (14 : 1) PC, diC (22 : 1) PC でそれぞれ約 +2 kJ/mol, 約 +8 kJ/mol の  $\Delta G_t$ )。薄い膜ではエントロピーの減少、厚い膜ではエンタルピーの増加により分配が妨げられていることが明らかになり、薄い膜と厚い膜での疎水性ミスマッチに対する応答は大きく異なることが示唆された。最も分配し易い膜疎水部の厚さ (約 25 Å) は、ヘリックス長 (31.5 Å) に比べ少し薄かった。ただし、平均的なヘリックスの疎水部の長さは、幾何学的な配置を考慮に入れた場合、両端の残基間から計算した長

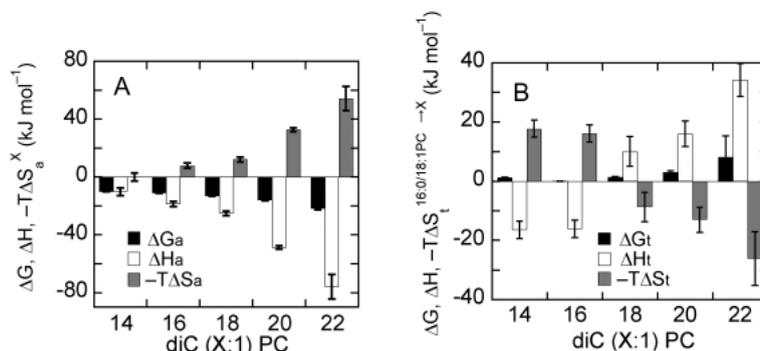


Fig. 6. Thermodynamics of Hydrophobic Mismatch

Thermodynamic parameters for the helix association (A) and the helix transfer (B) at 35°C in doubly monounsaturated phosphocholines (diC (X : 1) PCs). Hydrophobic thicknesses of diC (X : 1) PCs were estimated assuming linear relationship of the thickness to acyl chain carbons as following: diC (14 : 1) PC : 20 Å, diC (16 : 1) PC : 23.5 Å, diC (18 : 1) PC : 27 Å, diC (20 : 1) PC : 30.5 Å, diC (22 : 1) PC : 34 Å.

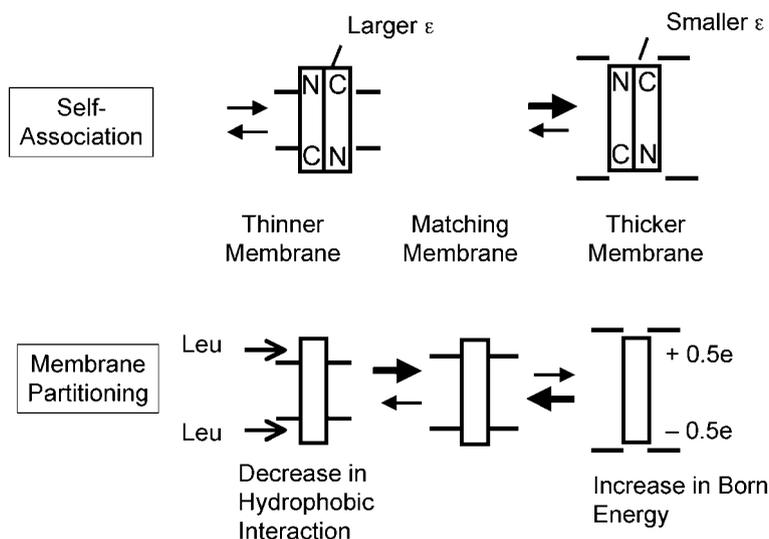


Fig. 7. Alterations in Electrostatic and Hydrophobic Interactions of the Transmembrane Helix in Response to Hydrophobic Mismatch

Stronger attraction between helix macrodipoles originated from smaller dielectric environments of the helix terminus in thicker membranes explains the stronger antiparallel dimer formation. The origins of unfavorable partitioning energies are different in thinner and thicker membranes. In thinner membranes, the exposure of hydrophobic residues, leucines, to aqueous environment seems to cause decrease in entropy while in thicker membranes, the burying of the helix termini into more hydrophobic environment results in an increase in the enthalpic Born energy. The balance of these contributions should determine the matching membrane thickness.

さよりも 2—3 残基 (3—4 Å) 分短いと考えられる。<sup>13)</sup>

以上の会合と移行の熱力学から、疎水部ミスマッチによってヘリックス末端の極性環境が変化することがヘリックスの挙動に大きく影響していると推察した。すなわち、会合に関しては、膜厚が増加するにつれてヘリックス末端がより疎水的な環境に置かれヘリックスマクロ双極子間相互作用が強くなってくる一方で、分配に関しては、薄過ぎる膜では疎水性側鎖が極性環境へさらされることによるエントロピー項の増大、厚過ぎる膜ではヘリックスマクロ双極子由来の末端部分電荷のボルンエネルギーの増大

が起こると考えた。この仮説をサポートするため、ヘリックス末端領域における主鎖アミドの H/D 交換能を質量分析法により評価した。diC (14 : 1) PC から膜厚を増やしていくと H/D 交換の度合いは減少し、diC (18 : 1) PC より厚くなるとほとんど変化がなくなった。少なくとも薄い膜で末端環境の極性が大きくなっていることが確かめられ、ヘリックスの長さに合うよう周囲の膜が変形するのではなく、疎水部ミスマッチに応じてヘリックス末端が膜界面での位置を変えることが示唆された。実際の膜タンパク質においても、膜厚とタンパク質の疎水部の長さのミスマッチに応じて、膜界面領域におけ

るヘリックスマクロ双極子間,あるいは極性,荷電側鎖間の静電的相互作用が大きく変化することが類推される。以上,膜厚による分配,会合挙動の変化をFig. 7にまとめた。

## 6. おわりに

本研究では,新規にデザイン,合成したinertなモデルペプチドと脂質二分子膜との相互作用をヘリックス間,ヘリックス-脂質間相互作用の熱力学の観点から調べた。脂質二分子膜系での膜貫通ヘリックスの会合や膜への分配,膜からの解離などの熱力学量を詳細に計測可能な実験系は他に類がなく,特に脂質組成の影響を直接に研究できるという点で強力なモデル実験系であると言える。今回用いたのは特定の相互作用を持たないinertなモデルペプチドであるため,ヘリックスマクロ双極子などのすべての膜貫通ヘリックスが持つ基本的な性質を反映したと考えられる。単純なデザインであっても脂質の種類によってヘリックスの膜分配や会合は大きく変化し,脂質の多様性を考慮した研究が不可欠であることを明確に示している。また,今回用いたペプチドは将来ゲスト配列を導入可能なホスト配列として有用であることを示した。今後ゲスト配列を導入したペプチドを用いて,膜タンパク質一般に適用可能な構造形成の駆動力のエネルギー論に踏み込みたい。

**謝辞** 本研究の遂行にあたり,終始懇篤なる御指導,御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科・松崎勝巳教授に深淵なる謝意を表します。モデルペプチド合成に関しては同志社女子大学薬学部・杉浦幸雄教授,京都大学化学研究所・二木史朗教授,大橋若菜修士,丹羽美紀修士に御協力を頂き,またスピンラベル ESR 測定に関して京都薬科大学・桜井弘教授,安井裕之助教授に御協力を頂きました。ここに深く感謝いたします。また終始有益な御指導と御協力を頂きました小林聖枝博士,小倉まい修士をはじめとする京都大学大学院薬学研究科薬

品機能解析学分野,薬品物性学分野,京都大学大学院生命科学科システム機能学分野の皆様にご心より感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) White S. H., Wimley W. C., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 319-365 (1999).
- 2) Popot J. L., Engelman D. M., *Biochemistry*, **29**, 4031-4037 (1990).
- 3) Engelman D. M., Chen Y., Chin C. N., Curran A. R., Dixon A. M., Dupuy A. D., Lee A. S., Lehnert U., Matthews E. E., Reshetnyak Y. K., Senes A., Popot J. L., *FEBS Lett.*, **555**, 122-125 (2003).
- 4) White S. H., von Heijne G., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 397-404 (2004).
- 5) Hessa T., Kim H., Bihlmaier K., Lundin C., Boekel J., Andersson H., Nilsson I., White S. H., von Heijne G., *Nature*, **433**, 377-381 (2005).
- 6) Cohen C., Parry D. A., *Proteins*, **7**, 1-15 (1990).
- 7) de Planque M. R. R., Killian J. A., *Mol. Membr. Biol.*, **20**, 271-284 (2003).
- 8) Yano Y., Takemoto T., Kobayashi S., Yasui H., Sakurai H., Ohashi W., Niwa M., Futaki S., Sugiura Y., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **41**, 3073-3080 (2002).
- 9) Cristian L., Lear J. D., DeGrado W. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 14772-14777 (2003).
- 10) Renthall R., Velasquez D., *J. Protein Chem.*, **21**, 255-264 (2002).
- 11) Yano Y., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **41**, 12407-12413 (2002).
- 12) Munro S., *Trends Cell Biol.*, **8**, 11-15 (1998).
- 13) Zhang Y.-P., Lewis R. N. A. H., Hodges R. S., McElhaney R. N., *Biochemistry*, **31**, 11579-11588 (1992).