

(研究題目) 機能性膜蛋白質のマニピュレーション
(Manipulation of functional membrane protein)

(研究者)

(代表研究者) 吉田 賢右, 東京工業大学 資源化学研究所, 教授
Masasuke Yoshida, Professor, Research Laboratory of
Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology

(協同研究者) 久堀 徹, 横浜市立大学 文理学部, 助手
Toru Hisabori, Research associate, Yokohama City University

3 英文サマリー

Methods of two dimensional gel electrophoresis for membrane proteins have been developed. A method using a new detergent, alkyl ether sulfate, was proved to be effective for analysis of membrane proteins from plant chloroplast and bacterial membranes. Another method, that is, combination of non-ionic detergent and anionic dye, was good for mitochondrial membrane proteins. General methods for renaturation of membrane proteins has not been found yet.

4-1 研究目的

生体膜の膜蛋白質は情報伝達、物質輸送、エネルギー変換等の重要な機能を果たしている。最近の遺伝子解析技術の進歩により、種々の機能を持つ膜蛋白質が次々と発見、同定され、更にそれらが多くの疾患となんらかの形で関係することが明らかになってきた。しかし、これら機能性膜蛋白質の分子レベルの作用機序を理解し、膜蛋白質の蛋白質工学を切り開いて医学、薬学的な応用に結び付けるためには膜蛋白質の高感度な分析、操作技術が必要である。そこで本研究計画は、1、膜蛋白質の未変性ゲル電気泳動法の技術及びこれを利用した二次元電気泳動法による簡便且つ高感度、精密な膜蛋白質の分析技術の実用化と、2、膜蛋白質の変性→再生技術の端緒を開く、の二点を目的とした。

4-2 研究経過および成果

1、膜蛋白質の2次元電気電気泳動から述べる。まず、エーテル結合を持つ陰イオン性界面活性剤（アルキル硫酸エーテル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム）存在下に1次元目の未変性電気泳動を行ない、2次元

目として通常のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）電気泳動を行なう方法を検討した。この方法で細菌の膜蛋白質および植物葉緑体チラコイド膜を分析すると、分解能の良い分離ができた。前者においては、この方法により始めて真正細菌からV型ATPaseが完全な形で（膜中部分も含めて）単離された。またチラコイド膜の分析では、光化学系IとIIが非常にきれいに未変性のまま分離することができて、さらに2次元目の泳動でその成分ポリペプチドがよく分離された。この分析によって、光化学系の新しい成分ポリペプチドの存在が見出された。この2例の成功をふまえて、次にミトコンドリアの膜蛋白質の分析も行なった。しかしミトコンドリアの場合は、蛋白質は分離されるものの、それに重なって星雲状の染色スミアが広い範囲に出現し、個々の蛋白質のスポットの検出と同定をさまたげた。このスミアの正体はリン脂質と思われる。これを電気泳動前に膜蛋白質を変性させることなく除去することを試みたが、うまくいかなかった。そこで、1次元目の電気泳動の界面活性剤を、アルキルエーテル硫酸から、非イオン性界面活性剤であるトリトンX-100に代えた。この場合、可溶化された膜蛋白質は未変性であるが泳動されるのに十分な負電荷を表面に持たないので、これに強く結合する陰イオン分子として、クマシーブルーGを加えた。この方法でミトコンドリアを分析したところ、良好な結果を得ることができた。電子伝達系の複合体I,II,III,IV,およびATP合成酵素の5つの複合体が1次元目の電気泳動で明瞭なバンドとして分離され、さらに2次元目の泳動で個々の複合体の構成ポリペプチドが分離された。

そこで、この方法を応用してヒトミトコンドリア遺伝病の解析を行なった。ミトコンドリアDNA(mtDNA)は、核染色体の約10倍の頻度で変異が発生する。変異は蛋白質部分だけでなくtRNAをコードする部分にも生じるが、この場合はどの蛋白質にまず支障がでるのか、DNAの変異から予言することはできない。mtDNAにコードされていてミトコンドリア内で合成される蛋白質は全て上記の5つの複合体のサブユニットなので、複合体を分析しなければ変異の影響を評価できない。このよな事情から、我々の膜蛋白質2次元電気泳動は、この目的に好適であると考えられた。

まずはじめに、正常細胞と人工的にmtDNAを欠失させた細胞のミトコンドリアを比較した。ミトコンドリア遺伝子を欠いたミトコンドリアでも、（合成量

が著しく減少しているものの) 複合体 II と ATP 合成酵素が存在していることがわかった。これらの複合体は、そのすべてのサブユニットが mtDNA ではなく、核遺伝子にコードされている点で他の複合体と異なる。逆に主要なサブユニットが mtDNA にコードされている複合体 IV は、mtDNA を欠いたミトコンドリアの 2 次元電気泳動では確認されなかった。

これらのコントロール標品に加えて、2 種類のミトコンドリア遺伝子病患者 (MELAS) のミトコンドリアの分析を行なった。それぞれ mtDNA の複製開始点を起点にして数えて 3243 および 3271 番目に点変異を持つ患者から単離されたもので、変異はいずれも Leu-tRNA(UUR) 遺伝子上にあるため、ミトコンドリア内での蛋白質合成になんらかの影響を与えていると予測されていた。正常ミトコンドリアとこれらの異常ミトコンドリアの 2 次元電気泳動像を比較解析した結果、異常ミトコンドリアでは、全体の蛋白量が少ないこと、特に複合体 III (Co-シトクロム c 還元酵素複合体) の合成に顕著な影響を与えていることがわかった。異常ミトコンドリアの複合体 III は正常ミトコンドリアのそれに比べ、減少しており、3271 変異より 3242 変異の方に著しい減少が確認された。さらに、3242 変異では複合体 III の移動速度が正常なものに比べ速くなっていることも確認された。両変異を持つ患者の症状はまったく区別が付かないことを考えると、両者に蛋白質レベルでの顕著な差が確認されたことは非常に興味深い。

2、膜蛋白質の変性 → 再生技術については、まず、バクテリオロドプシン (唯一つ、再生が報告されている) を用いて再生を確認し、次にウサギ骨格筋の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (大量にとれる、サブユニット構造がない、活性測定が容易などの利点がある) で種々の方法を試した。しかし、試みたどんな方法でも、いったん SDS 変性した Ca^{2+} -ATPase を再生することはできなかった。蛋白質の折れたたみを補助すると言われているシャペロニンの添加も無効であった。 Ca^{2+} -ATPase は数本の膜貫通領域と約 400 アミノ酸残基におよぶ膜外親水性部分を持つ。両者を同時に安定化するような均一溶液系は存在しないのかもしれない。しかし、研究の途上で一つのヒントとなる事実を知った。ラクトースキャリア蛋白質やテトラサイクリン排出ポンプ蛋白質は高度に疎水的な膜蛋白質であるにもかかわらず、界面活性剤を含まない尿素溶液に溶けるのである。これを手がかりにさらに研究を進めたい。

4-3発表論文リスト

横山謙、赤羽康宏、石井則行、吉田賢右：

Isolation of prokaryotic VoV1-ATPase from a thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*;
J.Biol.Chem. 269, 12248--12253, 米国生化学会, 1994,3月