

タンパク質と有機材料との自己組織的ハイブリッド

Self-Assembled Hybrid of Protein and Organic Materials

代表研究者 九州大学工学研究科物質創造工学専攻・助教授 浜地 格
 Department of Chemistry & Biochemistry, Graduate School of
 Engineering, Kyushu University, Itaru HAMACHI

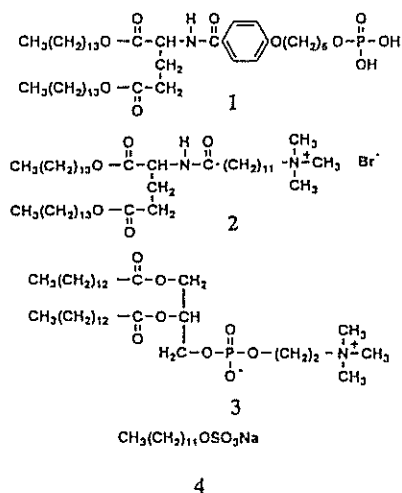
The structure-and-function-relationship of cytochrome c (Cyt-c) interacted with the lipid bilayer membranes was studied by various spectroscopic methods, the reaction-products analysis and its kinetics. Ultrafiltration binding assay, UV-visible, electron paramagnetic resonance (EPR), and circular dichroism (CD) spectroscopies showed that Cyt-c was tightly bound to the lipid-bilayer membranes bearing a phosphate head group. The anisotropic and nonnatural complexation with the phosphate-lipid membranes caused a spin-state change of the heme in the active center of Cyt-c. Depending on the membrane fluidity, two classes of the structurally altered Cyt-c were prepared and they showed the greatly enhanced N-demethylase activity. Products analysis by HPLC demonstrated that the lipid-membrane-bound Cyt-c performs a clean enzymatic reaction similar to native hemoenzymes. Kinetic study established that there are two different activation manners via the phosphate-lipid bilayer membranes: namely, simple enhancement of the affinity for H₂O₂, or the increased catalytic efficiency (k_{cat}) in addition to the enhanced affinity for H₂O₂. The membrane fluidity again significantly affected the N-demethylation kinetics. A potential of the lipid membrane assembly to functionalize native proteins and enzymes with noncovalent but specific interactions is also discussed.

研究目的

最近タンパク質を人工的に組織化して、機能性材料として利用しようとする試みが世界のいくつかのグループで開始された。本研究ではタンパク質を人工有機材料と自己組織的にハイブリッド化する際のタンパク質の挙動を分子論的に明らかにし、それに基づいてハイブリッド化の方法論を新たに開発することを目的とした。この研究の過程で得られる知見は、例えばバイオセンサーなどのバイオ複合材料の高機能化を可能にするだけでなく生体適合性の人工材料開発のための基礎的知見を与えるものと期待

される。

Chart 1



研究経過

タンパク質と人工有機材料との相互作用は極めて複雑であると予想されるので、タンパク質として構造情報を得られやすいヘムタンパク質（特にシトクロムc）をまた有機材料として両親媒性の脂質からなる脂質二分子膜を比較的単純なモデル系として用いた。脂質膜としては以下の四つを主に用いた。また詳細な検討のためにはリン酸親水部を持つ5種類をさらに合成した。

膜とシトクロムcとの相互作用はまず結合特性（限外濾過膜アッセイによった）から検討された。それによるとリン酸膜1のみが大きな結合能を持つことが示された。シトクロムcの等電点が10であることを考えると、タンパク質と膜表面との静電的相互作用が結合の主な駆動力であろう。ついで5種類のリン酸膜を用いて、相互作用の違いを（紫外可視吸収スペクトル、円偏光二色性、電子スピン共鳴などで）検討したところ、膜のゲル液晶相転移温度によって挙動が異なることが分かった。即ち相転移温度の高い膜との相互作用によって、シトクロムcは天然状態とは異なる高スピン状態のヘム活性中心へと変化した。一方、相転移温度の低い膜との結合では、シトクロムcは天然と同じ低スピン状態であった。しかし自動酸化速度や小分子リガンドとの反応特性の検討から、活性中心の揺らぎなどの動的特性が極めて大きくなっていることが示された。

このような脂質膜とのハイブリッドによるシトクロムcの構造変化は、このタンパク質から天然にはない新たな酵素活性を引き出すことが以下の式に示す過酸化水素を酸化剤としたN脱メチル化反応解析によって明らかとなった。

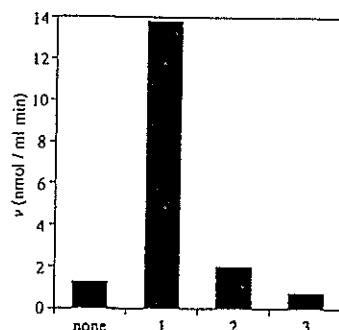
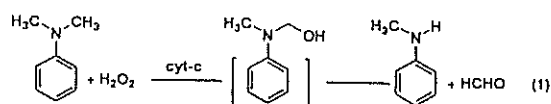


Figure 1. Dependence of the initial rate of *N*-demethylation on matrix membranes: 5 μM Cyt-c, 2 mM *N,N*-dimethylaniline, 1 mM H_2O_2 , and 250 μM matrix membranes (1, 2, or 3) in 25 mM phosphate buffer (pH = 7.0) at 30 °C. The reaction was terminated after 5 min by addition of 30% trichloroacetic acid, and the amount of the formed formaldehyde was determined according to the Nash method.^{6,7} The amount of product formaldehyde increased linearly with time.

ここでもリン酸膜が極めて効果的であった。また構造の異なるリン酸膜5種の検討から、やはり脂質膜の流動性がこの酵素反応ともよく関連し、相転移温度の低い膜ほど高活性であることが分かった。また詳細な速度論解析を行うと、相転移温度の高い膜では過酸化水素との親和性の上昇が酵素

活性増幅の主な原因だったのに対して、相転移温度の低い膜では過酸化水素との親和性に加えて、反応活性そのものが增大していることが示された。シトクロムcの動的特性の変化がこのような変化をももたらしたものと考えられる。またシトクロムcの脂質膜に対する配向性をハイブリッドフィルムにして検討すると、シトクロムc表面の特定のカチオンドメインをリン酸膜と相互作用させて規則的に配向していることが明らかになった。

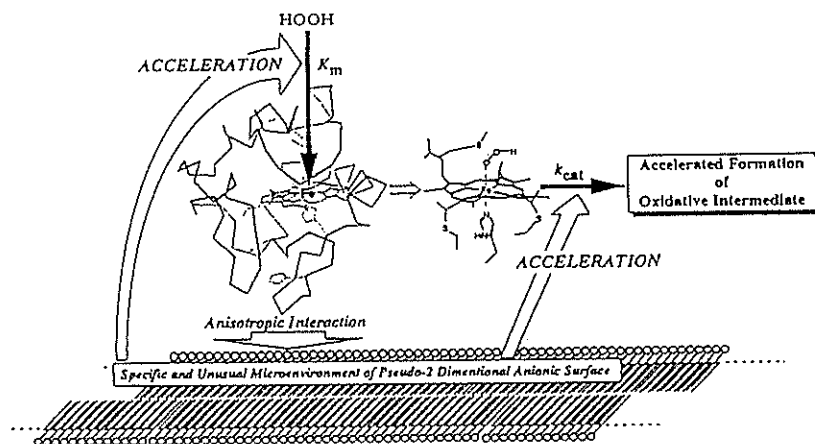
研究成果

以上のように合成脂質膜とのハイブリッドによってシトクロムcというヘムタンパク質が構造と機能の両面で摂動を受けて酸化酵素様の機能を発現することが分かった。この相互作用モードは用いる膜の表面電荷の他に流動性（柔らかさ）という物理化学的特性によって2種類に分けられた。即ち流動性の高い膜ではより大きな酵素活性の誘導が見られただけでなく、シトクロムcの活性中心の揺らぎ・運動性が増大してこのような機能変換を引き起こすことが

明らかとなった。一方、流動性の低い膜では、シトクロムcのダイナミクスに関する知見は得られなかったが、活性中心の構造自体が脂質膜との相互作用によって全く異なるものへと変化していることが示された。またこの場合、脂質膜に対するシトクロムcの配向挙動から天然に見られるシトクロム酸化酵素との複合体形成とは異なる部位で脂質膜・シトクロムcの相互作用が起これ、このことが機能変換を引き起こすトリガーとなることが示唆された。

今後の課題と発展

このように本研究によって脂質膜の特性によってタンパク質の構造と機能に異なる変化がもたらされることが明瞭に示されたと言える。このことをもっと一般的に考えると、脂質膜のような分子集合体とタンパク質との非共有結合的な相互作用がタンパク質から特定の機能・反応活性を誘導するために有効な方法論となりうる可能性を示唆しているように思われる。しかもその際に用いる分子集合体の物理化学的特性が極めて重要な要素となるようだ。実際に他の



酵素についても人工膜が活性制御のエフェクターとなる例も見出され始めており、もっと広範な分子集合体とタンパク質とのハイブリッドが検討されればタンパク質・酵素工学の新しい方法論となることも期待されるであろう。そのためには本研究で報告したような分子レベルでの構造と機能の研究が他の系でも是非とも必要とされる。

発表論文リスト

"Protein Engineering using Molecular Assembly: Functional Conversion of Cytochrome c via Noncovalent Interactions"
Itaru Hamachi, Akio Fujita, Toyoki Kunitake,
J. Am. Chem. Soc., 1997, in press