

産総研・樋口真弘・古賀智之・田口和宏、名工大 木下隆利

[緒言] 生体の高度な情報の受容・変換・伝達機能は、生体膜中に存在する膜タンパク質により担われており、膜中における同タンパク質の高次構造変化が、これら機能の発現およびその制御に密接に関連している。本研究では、認識対象分子により誘起される特異なポリアミノ酸集合体構造を利用し、対応する受容体の構築を試みた。具体的には、アセチルコリンレセプター(nAChR)及び GABA レセプター(GABA_R)を対象とし、各の基質結合部位に存在するアミノ酸, Asp, Tyr, Trp[1]及び Ser[2]を末端に導入したポリメチルグルタマートをそれぞれ合成し、脂質膜中で基質により誘起されるポリペプチド分子集合体の基質認識能について検討した。さらに同ポリペプチド側鎖を部分的に親水化し、基質により誘起されたペプチド集合体を介するイオン透過性に関し検討した。

[結果及び考察] s-PMG(Asp), s-PMG(Tyr), s-PMG(Trp), s-PMG(Ser)及び s-PMG を含む DPPC 複合単分子膜を 0.1 mM の ACh あるいは GABA を含む buffer 上にそれぞれ形成し、基質との相互作用により膜中に形成されたポリアミノ酸集合体による基質認識特性を SPR 法により評価した。膜調製時に下水相に添加した基質との相互作用により、膜中でポリアミノ酸は再配列し、対応する基質を特異的に認識する集合体を形成した。そこで、この集合体を介するイオン透過性を膜電位の変化から検討した。各ポリアミノ酸は、側鎖を 5% 加水分解し、グルタミン酸としたものを用いた。測定にはベシクル系を用い、系に加えた di-S-C₃(5)の蛍光強度の変化より評価した。ベシクル内、外水相にはそれぞれ 200mM の Glu-K 及び Glu-Na を用いた。di-S-C₃(5)は膜の電位が脱分極側にずれる時、すなわち、膜のイオンの透過性が高くなると蛍光強度が増加することが知られている。比較のためにカチオンチャンネルであるグラミシジン添加すると、蛍光強度の増加が確認された。そこで、ACh 中でインキュベートしたベシクル二分子膜の膜電位を、ACh 及び GABA 添加前後でそれぞれ測定したところ、ACh 添加により有意な蛍光強度の減少、すなわち、膜は過分極したが、GABA の添加では蛍光強度の変化はほとんど見られなかった。すなわち、添加した基質は、それが誘導したペプチド集合体に選択的に再結合し、同集合体を介するイオン透過性を抑制していることが示唆された。

1. Z. Zhong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **95**, 12088 (1998).
2. T. Galvez et al., *J.Biol. Chem.* **274**, 13362 (1999).

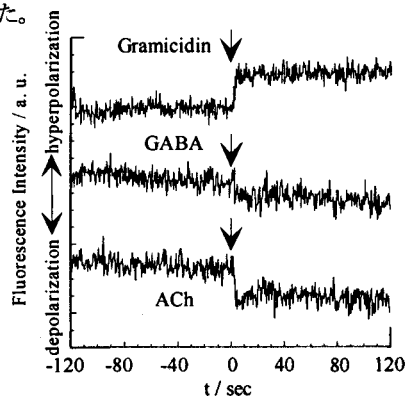


Fig.1. Substrate-induced fluorescence intensity changes of di-S-C₃(5) in DPPC vesicle containing polypeptides that incubated with ACh.

名工大・工 〇横井秀典・木下隆利

本研究では、分子認識能を有しかつ親水性であるβ-シクロデキストリン(β-CyD)を分子鎖末端に配したポリ(γ-メチル-L-グルタマート)(PMLG₃₄-CyD)を調製し、油/水界面におけるその単分子膜の構造・機能を解析した。その結果、β-CyD 部が水相に面するように PMLG₃₄-CyD の分子配向を制御した状態で、水相にβ-CyD のゲスト分子である 1-アダマンタンカルボン酸(ADC)を添加したところ、周期的な界面圧の変化が観測された。

PMLG-CyD 単分子膜の調製は、n-ヘキサン/水界面に PMLG-CyD の DMF 溶液を逐次展開することにより行った。単分子膜形成後、ADC 水溶液を水相に添加し、Wilhelmy 法によって界面圧の時間変化を測定した。

ADC 添加後(ADC 添加時を横軸ゼロ秒とした)の PMLG₃₄-CyD 単分子膜の界面圧変化を Fig.1 に示した。ADC 添加の約 50 秒後から界面圧の上向きのピークが発生し、その後下向きのピークに変化するというパターンを示した。また ADC に誘起される PMLG₃₄-CyD 単分子膜の振動は、1~2 秒の周期であることが確認された。これはゲストとして 2-P-トルイジニルナフタレン-6-スルホン酸カリウム塩(TNS)を用いたときの振動¹⁾とは、逆のパターンである。また ADC に誘起される PMLG₃₄-CyD 単分子膜の振動は、1~2 秒の周期であり、TNS に誘起される場合(振動周期 18 秒)とは大きく異なっている。CyD に対する TNS および ADC の結合定数を比較すると後者(3.3 × 10⁴)は前者(2.5 × 10³)より一桁高い²⁾。CyD に対するゲスト分子の結合能の違いが振動のパターンや周期に大きく影響していると思われる。このようなゲスト分子種を認識し、振動の周期及びパターンの変化として応答する界面単分子膜システム構築には、CyD の分子認識能に加え、界面におけるペプチド分子の分子配向とペプチド間相互作用が重要であると考えている。

- 1) T. Kinoshita, T. Doi, A. Kato, H. Hosokawa, Y. Tsujita, and H. Yoshimizu, *Chaos*, **1999**, *9*, 276.
- 2) A. Janshoff, C. Steinem, A. Michalke, C. Heneke, and H. J. Galla, *Sensors and Actuators B*, **2000**, *70*, 243.

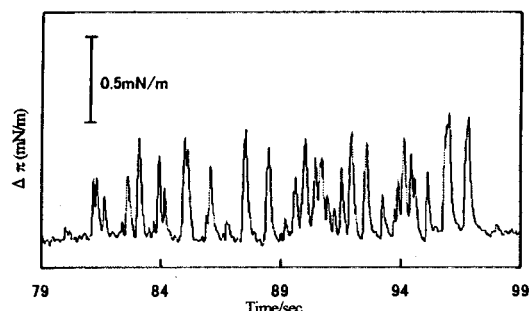


Fig.1 Oscillation of the interfacial pressure of PMLG₃₄-CyD monolayer at the n-hexane/water interface induced by adding ADC into the water phase (2.1 × 10⁻³M) at time = 0.