

プロテオリポソームを用いた リン脂質フリップフロップの評価

(1 京大院薬、2 富山大院医薬、3 福井大医) ○中尾裕之¹・若林真樹¹・池田恵介²・石濱泰¹・岩本真幸³・清水啓史³・老木成稔³・中野実²

【目的】生体膜を構成するリン脂質の二層間での移動(フリップフロップ)には膜タンパク質が関与することが示唆されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。pH 依存性のカリウムチャンネル KcsA は四量体の中心にポアを有し、中性条件ではその一端が 4 つの膜貫通ヘリックスによって閉じられた構造(ゲート)をもつが、酸性条件においてそれらのヘリックスの大きなねじれ運動によりゲートが開閉する。本研究では、ゲートの開閉という膜貫通領域の揺らぎがフリップフロップを誘起するのではないかと仮定し、KcsA を再構成したプロテオリポソームにおけるフリップフロップを蛍光分光法により評価した。また、KcsA の N 末端に存在する両親媒性ヘリックス(M0 ヘリックス)の効果についても検討した。

【方法】Phosphatidylcholine (PC) と KcsA とのモル比が 500:1 のプロテオリポソームを透析法により調製した。ここに蛍光脂質 C₆NBD-PC を PC に対して 0.2% 加えて外葉のみを蛍光標識した。この外葉標識リポソームを 37°C で種々の時間インキュベーションした後、水溶性の還元剤 dithionite を添加し外葉に残存する蛍光脂質による蛍光を消光させた。Dithionite 添加前後の蛍光強度比から内葉に移行(フリップ)した蛍光脂質の割合を求め、その時間変化から、蛍光脂質のフリップの初速度を算出した。

【結果・考察】蛍光脂質のフリップ速度は KcsA を再構成することで上昇した(Fig.1)。ゲートが閉じた条件(pH 7.4)と比較して、ゲートが開閉する条件(pH 4.0)でフリップ速度の上昇が見られた(Fig.1)。しかし、KcsA のブロッカー tetrabutylammonium を加えてゲートを開いたまま静止させても、フリップ速度は変化しなかった(data not shown)。この結果から、ゲートの開閉という膜貫通領域の揺らぎはフリップフロップに影響しないと考えられた。

M0 ヘリックスは膜表面に局在し、酸性条件下で酸性リン脂質と相互作用することでゲートの開構造を安定化する。M0 ヘリックスを欠損させた変異体(KcsA ΔM0)を再構成したところ、pH 7.4 と pH 4.0 でのフリップ速度の変化があまり見られなかった(Fig.1)。このことから、野生型 KcsA で見られた酸性条件でのフリップ速度の上昇に M0 ヘリックスが関与することが示唆された。

Analysis of phospholipid flip-flop by using proteoliposome

H. NAKAO¹, M. WAKABAYASHI¹, K. IKEDA², Y. ISHIHAMA¹, M. IWAMOTO³, H. SHIMIZU³, S. OIKI³, M. NAKANNO² (1. Kyoto Univ., 2. Univ. Toyama, 3. Univ. Fukui, mnakano@pha.u-toyama.ac.jp)

Phospholipid flip-flop in biomembranes is regulated by transmembrane proteins, but the mechanism is still unknown. KcsA is a pH-dependent potassium channel, activated by acidic pH. It has been reported that KcsA largely changes the conformation of its transmembrane region at acidic pH. We hypothesized that the fluctuation of the transmembrane region induces flip-flop of phospholipids. KcsA was reconstituted to liposomes and flip-flop in the proteoliposomes was measured by dithionite reduction assay. The results indicated that the fluctuation of the transmembrane region would not affect flip-flop. However, the experiment using KcsA mutant suggested that M0-helix, which is an amphiphatic helix at N-terminal of KcsA, enhances flip-flop of phospholipids at acidic pH.

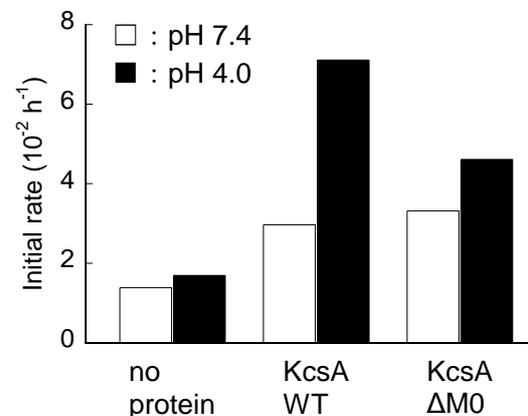


Fig.1 Initial flip rate of C₆NBD-PC.