

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03768

研究課題名(和文)天然物由来の脂質・膜タンパク質複合体が見せる協奏作用と分子機能の解明

研究課題名(英文) Cooperative effects of natural-derived lipids and membrane proteins in lipid bilayer membranes

研究代表者

手老 龍吾 (Tero, Ryugo)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40390679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜モデル系である脂質二重膜内において、複数の膜タンパク質分子および周囲の脂質分子によって作られる活性状態と、その分子レベルのメカニズムを解明することを目的とした。支持脂質二重膜(SLB)を用い、培養細胞系と無細胞タンパク質合成系それぞれにより取得したチャネルタンパク質を再構成し、その分布と構造を観察した。SLB内において細胞膜由来の成分が独立したドメインを形成すること、その再構成過程における膜内微小ドメインの役割を明らかにし、再構成機構を説明するモデルを提案した。無細胞合成で発現したチャネルタンパク質の膜内分子配向が、再構成過程に依存して変化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to elucidate the active state created by a plurality of membrane proteins and surrounding lipid molecules, and relating phenomena using a cell membrane model system. We reconstructed ion channel proteins that were obtained from cultured cells and cell-free protein synthesis system, in supported lipid bilayers (SLBs). Distribution and molecular structures of lipids and membrane proteins were observed by fluorescence microscopy and atomic force microscopy. We propose a model to explain the mechanism of reconstitution by clarifying the role of cell membrane derived components in SLB. We revealed that the role of intra-membrane microdomains in the reconstitution process. It is revealed that the molecular orientation of the channel protein expressed by cell-free synthesis varies depending on the reconstitution process.

研究分野：界面物理化学

キーワード：脂質二重膜 膜タンパク質 原子間力顕微鏡 蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生命活動は細胞内外での情報・物質・エネルギーのやり取りで成り立っており、その授受は細胞膜と膜タンパク質を介して行われている。細胞膜反応においては脂質と膜タンパク質が作る 2 次元集合体(クラスター・ドメイン等)内で複数の分子が協奏的に働くことによって反応の on/off 制御や高効率化といった機能が発現する。代表的な膜タンパク質であるイオンチャネルのイオン電流計測においては、複数の分子が協同的に open/close する「バースト」現象が報告されている。研究代表者がこれまで用いてきた人工脂質二重膜系と分子観察技術を用いることで、脂質分子と膜タンパク質複合体による機能発現の機構を明らかにすることができると着想した。

2. 研究の目的

イオンチャネルタンパク質を対象として、天然物由来の脂質とタンパク質で作製した生体膜モデル反応場を用いることとした。培養細胞の全細胞膜成分を抽出して使用することで、細胞膜に含まれる脂質・タンパク質・糖鎖がほぼ全て含んだ系を作製することができる。また、天然物から抽出した脂質を用いて作製した脂質二重膜に無細胞合成系を用いて発現した膜タンパク質を再構成することで、脂質組成は天然に近い条件で純度の高いタンパク質は取得することが可能である。天然抽出物をそのままブラックボックスとして用いるのではなく、培養細胞系と無細胞タンパク質合成系を併用して制御下での複雑化を行った。固液界面に形成される人工脂質膜系である支持脂質二重膜(supported lipid bilayer: SLB)を用いて、天然物由来の脂質とタンパク質からなく生体膜モデル系を構築し、イオンチャネルとその周囲の脂質分子の分布および構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞から抽出したプロテオリポソーム(PL)および、無細胞合成法によって調製した PL を SLB 系に再構成する。あらかじめ作製した SLB に PL を融合する方法および、PL で SLB を作製する方法を用い、それぞれの手法で作製した SLB について膜内分子分布と分子構造を蛍光顕微鏡および原子間力顕微鏡(AFM)を用いて観察した。膜タンパク質の失活を防ぎ、また機能を制御するために SLB の固体基板表面の化学修飾による制御と、電位感受性色素による評価を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞由来 PL の SLB への融合と分子分布

チャンネル電流計測に用いられる黒膜系と同組成の SLB を作製し、細胞由来のプロテオリポソームが融合する過程をその場観察した。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞由来の PL 成分が周囲と分離してドメインを形成すること(図 1a)、SLB 中に存在する微小ドメインが融合サイトとして働いていることを

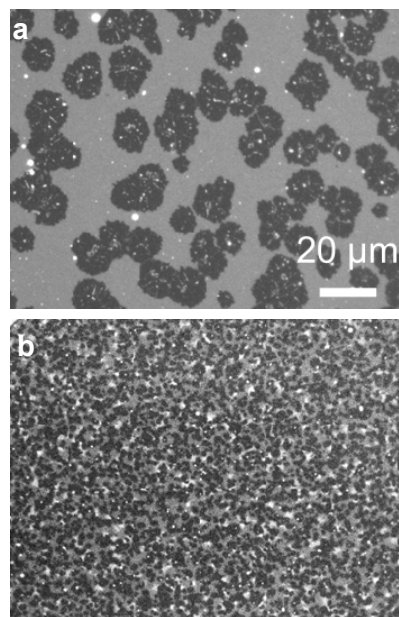


図 1. (a)CHO 細胞、(b)HEK293 細胞由来 PL 融合後の SLB の蛍光顕微鏡像。

明らかにした。また、human embryonic kidney (HEK293) 細胞由来の PL 用いた観察を行い、PL の融合とドメイン形成は同様に進行するものの(図 1b)、形成されるドメインの分布と数密度が CHO 細胞由来のものとは大きく異なることを見出した。

膜融合過程に関して得られた実験結果から、以下のことが明らかになった。(1) PC+PE+Chol-SLB 内では脂質分子が側方拡散していた；(2) 膜融合は特定のサイトから進行し、そのサイトは PC+PE+Chol-SLB 内に AFM で観察される微小ドメインであった；(3) PL 融合後の PC+PE+Chol-SLB 領域には微小ドメインが観察されず、PL 由来のドメインは境界付近に膜タンパク質が少ない領域が存在した；(4) 細胞種によりドメインの密度と大きさが異なった。これらの結果をもとに、膜融合の機構として、SLB への PL の融合過程には①微小ドメインへの PL 融合と、②その後の分子側方拡散を介した微小ドメインの消失、の 2 つの素過程が含まれていると考察した。この機構に基づく速度論モデル(図 2)を構築してドメイン成長のシミュレーションを行った結果から、①の膜融合過程の速度定数の違いによって少数のドメインが大きく成長する(CHO 細胞由来、図 1a)か、多数の小さな

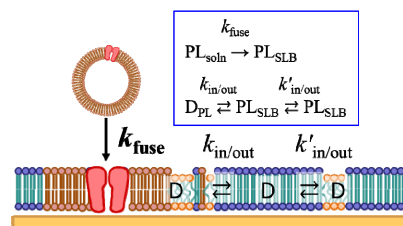


図 2. SLB への PL 融合過程と速度論モデル。

ドメインが生じるか(HEK293 細胞由来、図 1b)の違いを説明することができた。

(2) 無細胞合成 PL の SLB 系への再構成

多くのイオンチャネルは整流性を持つため、人工脂質二重膜系においてイオンチャネルが再構成されるか向きを知り、制御することは重要な課題である。無細胞合成法によって調製したイオンチャネル(KAT1)を含有する PL を用いて SLB にイオンチャネルを再構成し、AFM 観察することで、イオンチャネルの分子配向について調べた。あらかじめ形成した支持脂質二分子膜に PL を融合させると、PL 内に含まれる膜タンパク質は PL 外側の膜外領域が上側を向く”outside-up”の配向を取ると予想される(図 3a)。一方、PL を基板上で開裂させて SLB を作製すると、PL 内に含まれる膜タンパク質は PL 内側の膜外領域が SLB 上側を向く”inside-up”の配向を取ると予想される(図 3b)。

KAT1 を再構成した SLB 内には AFM 形状像に多数の隆起物(protrusion)が観察された。個々の protrusion の高さを計測して得られた分布をヒストグラムには、高さ約 1.6 nm と約 2.7 nm の 2 つの成分が存在した。これらは上向きまたは下向きの KAT1 の大きさの異なる膜外領域に由来すると考えられる。PL の融合による再構成(図 3a)では 1.6 nm の成分比が大きく、この成分は outside-up で PL 外側に位置していた KAT1 の膜外領域であると推定される。一方、PL の開裂(図 3b)の場合、形成時の PL 濃度が低く時間が短い場合には高さ約 2.7 nm の成分割合が大きく、また高さ成分の割合が PL 濃度と形成時間に依存して変化した。この結果から、初期においては PL の開裂(図 3b)が進み、脂質二分子膜が形成されてその被覆率が上がるとその膜への融合(図 3a)が起きた、と説明できる。あらかじめ超音波を印加して膜内分子配向を乱した PL を用いた場合には、2 つ成分の割合はインキュベーションの条件に依らずほぼ 50:50 であった。以上の結果から、無細胞合成法で調製したイオンチャネルの分子配向が PL 内で揃っていること、また支持脂質二分子膜系での KAT1 の分子配向を制御しうることが示された。

(3) 基板表面を活用した脂質膜制御

SLB 系において脂質二重膜は厚さ約 1~2 nm の水の層を介して固体基板に存在するため、SLB の構造や物性が固体基板の影響を受けうることが知られている。本研究課題で脂質二重膜の構造と膜流動性を計測する過程において、SLB 内の分子速報拡散性が固体基板材料に強く依存し、異方性や非対称性が現れることを見出した。蛍光一粒子追跡法で熱酸化 SiO₂/Si、マイカ、単結晶 Al₂O₃ 基板上的 SLB の拡散係数を計測した。SiO₂/Si 基板上では等方的な 1 成分の拡散係数が検出されたのに対し、マイカ

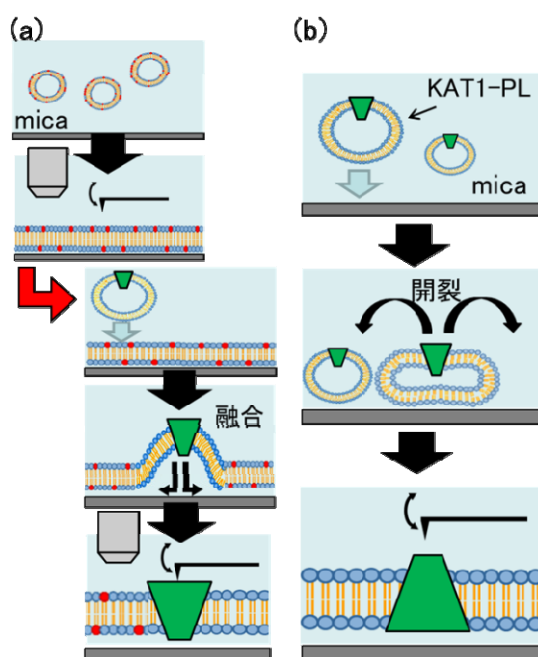


図 3. 支持脂質二分子膜への再構成過程に依存した膜タンパク質の配向。(a) PL を融合: outside-up. (b) PL を開裂: inside-up.

表面では 2 成分の拡散係数が、単結晶 Al₂O₃ 上では基板表面原子ステップに並行方向と垂直方向で拡散係数が異なる異方性が検出された。細胞膜内に発現する脂質二重膜の非対称性や異方性を、固体基板表面を用いて SLB 系で再現出来たと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

<査読有り>

(1) Y. Kakimoto, Y. Tachihara, Y. Okamoto, K. Miyazawa, T. Fukuma and R. Tero, "Morphology and Physical Properties of Hydrophilic-Polymer-Modified Lipids in Supported Lipid Bilayers", *Langmuir*, in press, (2018), 10.1021/acs.langmuir.8b00870.

(2) R. Tero, K. Fukumoto, T. Motegi, M. Yoshida, M. Niwano and A. Hirano-Iwata, "Formation of Cell Membrane Component Domains in Artificial Lipid Bilayer", *Sci. Rep.*, **7**, 17905 (10 pages) (2017), 10.1038/s41598-017-18242-9.

(3) T. Motegi, K. Yamazaki, T. Ogino and R. Tero, "Substrate-Induced Structure and Molecular Dynamics in a Lipid Bilayer Membrane", *Langmuir*, **33**, 14748-14755 (2017), 10.1021/acs.langmuir.7b03212.

(4) K. Imai, T. Horio, T. Hattori, K. Sawada and R. Tero, "Formation of Lipid bilayer on Ion Image Sensor and Measurement of Ion

Concentration Change", *Extended Abstract of the 2017 International Conference on Solid State Devices and Materials*, 953-954 (2017).

(5) Y. Okamoto, T. Motegi, K. Morita, T. Takagi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama and R. Tero, "Lateral Diffusion and Molecular Interaction in a Bilayer Membrane Consisting of Partially Fluorinated Phospholipids", *Langmuir*, **32**, 10712-10718 (2016), 10.1021/acs.langmuir.6b02874.

(6) R. Tero, R. Yamashita, H. Hashizume, Y. Suda, H. Takikawa, M. Hori and M. Ito, "Nanopore formation process in artificial cell membrane induced by plasma-generated reactive oxygen species", *Arch. Biochem. Biophys.*, **605**, 26-33 (2016), 10.1016/j.abb.2016.05.014.

(7) Y. Suda, R. Tero, R. Yamashita, K. Yusa and H. Takikawa, "Reduction in lateral lipid mobility of lipid bilayer membrane by atmospheric pressure plasma irradiation", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55**, 03DF05 (2016), 10.7567/JJAP.55.03DF05.

<査読無し>
邦文解説記事等 9 件

〔学会発表〕 (計 37 件)
<招待講演>

(1) R. Tero, T. Motegi, K. Yamazaki and T. Ogino "Substrate-induced asymmetric and anisotropic diffusion in supported lipid bilayers", 9th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics, Mar. 01, 2018, Sendai, Japan.

(2) 手老 龍吾, "超解像顕微鏡の基礎: 可視光を使った高解像観察", 第 17 回日本表面科学会中部支部学術講演会, 2017 年 12 月 16 日, 名古屋・名古屋大学.

(3) R. Tero, Y. Suda, F. Oike, Y. Hirose and H. Kurita "Effects of Plasma Irradiation on Artificial Cell Membranes", 14th International Conference on Flow Dynamics, Nov. 02, 2017, Sendai, Japan.

(4) R. Tero, "Effect of chemical stimulation to morphology of artificial cell membrane systems", 8th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics, Mar 07, 2017, Sendai, Japan.

(5) 手老 龍吾, "Structures and properties of artificial cell membrane systems on graphene oxide and oxide substrates", 大阪大学フォトニクスセンターセミナー, 2017 年 1 月 18 日, 大阪・大阪大学.

(6) R. Tero, "Reconstruction Process and Orientation of Membrane Proteins in Artificial

Cell Membrane Systems", Pacific Rim Symposium on Surfaces, Coatings & Interfaces (Pacsurf2016), Dec 14, 2016, Kohala Coast, Hawaii, USA.

(7) 手老 龍吾, "人工細胞膜系における膜内 2 次元ドメインの構造・物性・反応性", 物性研機能物性セミナー, 2016 年 10 月 14 日, 柏・東京大学物性研究所.

(8) 手老 龍吾, "蛍光一分子観察と原子間力顕微鏡で見る人工細胞膜モデル内の構造・物性・反応性", 第 44 回薄膜・表面物理セミナー「最先端バイオイメージング技術の基礎と応用」, 2016 年 7 月 29 日, 東京・早稲田大学西早稲田キャンパス.

(9) 手老 龍吾, "人工脂質二重膜を用いた膜内ドメイン構造およびダイナミクスの観察", 「難治性疾患治療開発のための革新的イメージング生物学の確立」平成 27 年度研究成果発表会, 2016 年 5 月 23 日, 金沢・金沢医科大学.

(10) R. Tero, K. Fukumoto, Y. Suzuki and Y. Niiyama "Observation of supported lipid bilayer membranes incorporated with membrane proteins.", 10th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, Mar 02, 2016, Sendai, Japan.

(11) R. Tero "Artificial biomembrane system on inorganic oxides and graphene oxide", 2015 International Symposium for Advanced Materials Research (ISAMR 2015), Aug. 17, 2015, Sun Moon Lake, Taiwan.

<一般発表>
国際会議 17 件、国内会議 9 件

〔図書〕 (計 1 件)
(1) R. Tero, "Regulation of Cell Membrane Transport by Plasma" Plasma Medical Science (S. Toyokuni et al. (Ed), Elsevier), 4-5-1, in press (2018).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://ens.tut.ac.jp/interface/index_jp.html
https://www.eurekalert.org/pub_releases/2018-02/tuot-oc013118.php

6. 研究組織
(1) 研究代表者

手老 龍吾 (TERO, Ryugo)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准
教授
研究者番号：40390679

(2) 研究分担者

平野 愛弓 (HIRANO-IWATA, Ayumi)
東北大学・材料科学高等研究所・教授
研究者番号：80339241

戸澤 譲 (TOZAWA, Yuzuru)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：90363267

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福本 幸平 (FUKUMOTO, Kohei)
鈴木 祐哉 (SUZUKI, Yuya)
新山 侑哉 (NIIYAMA, Yuya)
岡本 吉晃 (OKAMOTO, Yoshiaki)