

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17H03660
研究課題名（和文）トランスポーターの1分子構造機能解析の実現

研究課題名（英文）Single molecule analysis of transport proteins

研究代表者
渡邊 力也（Rikiya, Watanabe）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：30540108
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、私たち自主開発したトランスポーターの1分子計測技術群を総動員することで、人工生体膜に埋め込んだFoF1における構造変化と物質輸送活性の1分子計測を実現した。また、当該技術を他のトランスポーターの1分子解析へも拡張することに成功しており、今後は更なる研究活動の発展が期待できるものと確信している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポーターは、構造変化と共役して標的分子を輸送する膜タンパク質であり、細胞内の恒常性の維持に深く関わっている。近年、トランスポーターに関連する様々な疾患が同定され、トランスポーターの作動機構を詳細に解明することは、学術・産業の両面において急務とされている。本研究成果はトランスポーターの作動機序を理解する上で、重要な技術基盤の確立の第一歩であり、今後のトランスポーターの研究の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we succeeded to measure the conformational change and ion transport of FoF1 ATP synthase by using a novel artificial cell-membrane microsystem. In addition, we expanded the versatility of this platform to other transport proteins.

研究分野：1分子生物物理

キーワード：1分子生物物理 膜タンパク質 トランスポーター MEMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちの細胞は、リン脂質を主成分とする生体膜によって覆われており、その生体膜を介した分子の取込や排出は、トランスポーターに代表される輸送タンパク質によって制御されている。トランスポーターによる分子の輸送は、栄養素の取込、情報伝達、エネルギー合成など多岐にわたる生理機能と直結しているだけでなく、がん細胞や多剤耐性菌の薬剤への獲得耐性にも関与しているため、トランスポーターの作動機構の解明は、学術・産業の両面において急務とされている。トランスポーターは、ポアやチャネルなどの輸送タンパク質と異なり、構造変化と共役して標的分子を輸送する。そのため、トランスポーターの作動機構を解明するにあたり、立体構造解析、構造変化の動的計測、生化学計測などの多領域にわたる研究がなされており、素晴らしい研究成果が多数報告されてきた。残された最大の課題としては、トランスポーターの作動機構の根底をなす構造と機能の相関関係の解明にある。従来、構造と機能は主として個別に研究されており、構造と機能の相関関係を解明するためには、それらをつなぐ融合研究が必要不可欠であったが、技術的な障壁から実現していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が、自主開発した 1 分子計測技術群を総動員することで、トランスポーターの構造変化と物質輸送を同一の計測プラットフォームでかつ 1 分子単位で解析可能な技術基盤を世界に先駆けて開発し、それらの作動機構を詳細に解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が開発した新規マイクロチップに標的トランスポーターを再構成し、それらの機能と構造変化を光学顕微鏡により 1 分子単位で可視化した。

4. 研究成果

(1) F 型 ATPase の 1 分子構造機能解析の実現

本研究では、まず POC のため F 型 ATPase を研究対象とした。F 型 ATPase は ATP の加水分解エネルギーを利用して回転運動を行い、この回転運動と共役して生体膜を介したプロトンの輸送を行うトランスポーターである。本研究では、F 型 ATPase の作動機構の解明のため、新規生体膜マイクロチップを開発し、回転運動とプロトン輸送の 1 分子計測を同一の計測プラットフォームで実現するとともに、作動機構の解明のための技術基盤を確立した。具体的には、研究代表者がプロトン輸送計測のために開発した生体膜マイクロチップ(Nat Commun 2014b)に、従来の回転計測技術(Nat Commun 2013)を実装し、F_oF₁ の回転運動とプロトン輸送を同一のプラットフォームで計測することを可能とした(図 1: 未発表)。この計測プラットフォームを利用することで、今後は構造変化と物質輸送を同時計測することが可能となり、F 型 ATPase の作動機構の大幅な解明が期待される。

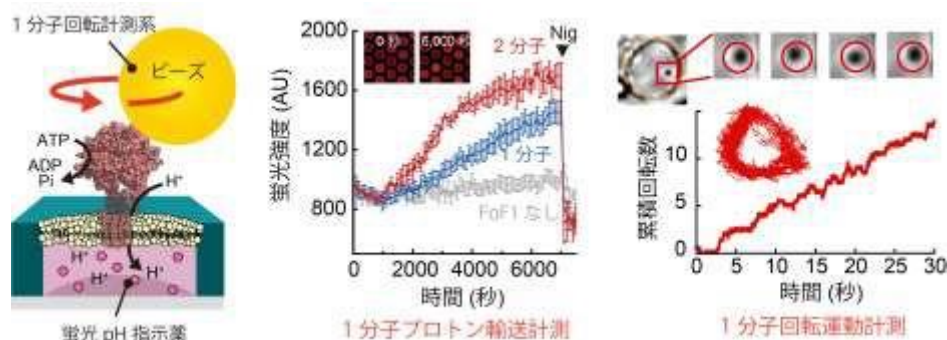


図 1 生体膜マイクロチップ上での F 型 ATPase の構造変化とイオン輸送の 1 分子計測

(a) 計測系模式図、(b)イオン輸送の 1 分子計測、(c) 回転運動の 1 分子計測

(2) 脂質輸送タンパク質の 1 分子機能解析の実現

上述の計測基盤の汎用性を拡張すべく、脂質輸送体を研究対象とした技術開発を行った。脂質は生体膜の主成分であり、生体膜を構成する 2 層構造に異なる組成で存在すること(非対称性)が知られている。この脂質組成の非対称性の維持・崩壊は、輸送様式の異なる多様な脂質輸送体の働きにより実現しており、また、様々な生理機能に深く関与している。本研究では、非対称な脂質組成をもつ生体膜マイクロチップを新規開発し、脂質輸送体の一種である TMEM16F の脂

質輸送を 1 分子単位で計測可能な技術基盤を確立した(図 2)。具体的には、光の照射で脂質組成の非対称性を形成できる新技術を生体膜マイクロチップへ実装し、脂質組成の非対称性が 1 分子の TMEM16F の脂質輸送によって崩壊する様子を世界で初めて可視化することに成功した(PNAS 2018)。今後は、TMEM16F の構造変化を可視化する機構を実装することで、TMEM16F の構造変化と機能の相関解析に基づいた大幅な作動機構の解明が期待される。

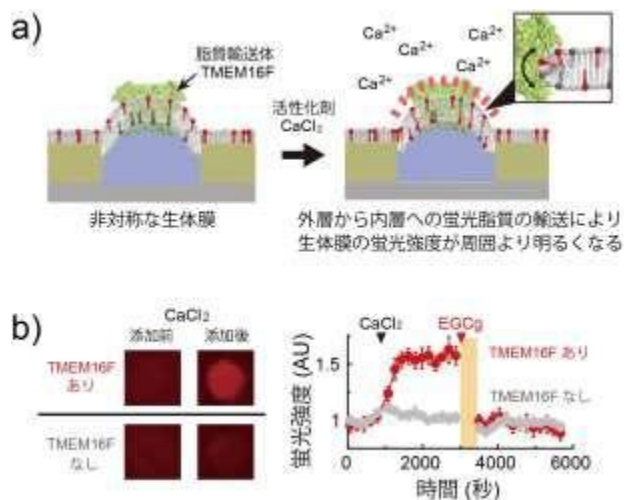


図 2 脂質輸送体(TMEM16F)の 1 分子機能計測

(a)脂質輸送の計測原理. (b) CaCl₂ 添加前後の共焦点蛍光画像および蛍光強度の経時変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe, R., Komatsu, T., Sakamoto, S., & Noji, H.	4. 巻 18
2. 論文標題 High-throughput single-molecule bioassay using micro-reactor arrays with a concentration gradient of target molecules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2849-2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8lc00535d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe, R., Sakuragi, T., Noji, H., & Nagata, S.	4. 巻 115
2. 論文標題 Single molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 3066-3071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1717956115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe, R., Soga, N., Ohdate, S., & Noji, H.	4. 巻 1700
2. 論文標題 Single molecule analysis of membrane transporter activity by using a microsystem	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 321-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7454-2_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rikiya Watanabe, Makoto Genda, Yasuyuki Kato-Yamada, Hiroyuki Noji	4. 巻 114
2. 論文標題 Essential Role of the Subunit for Reversible Chemo-Mechanical Coupling in F1-ATPase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 178-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2017.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Tamiya, Rikiya Watanabe, Hiroyuki Noji, Chun Biu Li, Tamiki Komatsuzaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of non-equilibrium angle fluctuation on F1-ATPase kinetics induced by temperature increase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys Chem Chem Phys	6. 最初と最後の頁 1872-1880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp06256g.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rikiya Watanabe, Naoki Soga, Shinya Ohdate, Hiroyuki Noji	4. 巻 1700
2. 論文標題 Single-Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity by Means of a Microsystem	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 321-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7454-2_17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡邊力也
2. 発表標題 Single molecule analysis of membrane transport proteins using artificial cell-membrane microsystems
3. 学会等名 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊力也
2. 発表標題 生体膜チップを利用した 膜タンパク質の1分子活性計測
3. 学会等名 Conbio 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rikiya Watanabe
2. 発表標題 Artificial cell-membrane microsystems for highly sensitive analysis of membrane proteins
3. 学会等名 PITTCON 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊力也
2. 発表標題 生体膜マイクロチップを利用した膜タンパク質の機能可視化
3. 学会等名 日本細菌学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考