

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19422

研究課題名（和文）膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性を制御した固定化平面膜の開発とAFM観察

研究課題名（英文）Development and AFM observation of immobilized planar membranes with controlled orientation of membrane proteins and asymmetry of lipid membranes

研究代表者

角野 歩（Sumino, Ayumi）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・助教

研究者番号：80717140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性を同時に制御した固定化平面膜の調製法を開発し、脂質膜の非対称性が機能に関わる膜タンパク質の動態を高速AFM観察することである。2019年度までに、液滴接触法によりAFM基板上で平面膜を調製することを試みた。探針走査型高速AFMの試料ステージ上で、マイクロマニピュレーターとマイクロインジェクターを用い、AFM基板上に均一な脂質薄膜を調製できた。しかし、探針走査型高速AFMの光学系が不安定という問題点があった。よって2021年度は、探針走査型高速AFMを、より動作が安定している試料走査型高速AFMに作り替え、安定動作できるレベルまで調整した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AFM基板上での膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性の同時制御ができれば、膜タンパク質の機能動態に及ぼす脂質の非対称性の影響などについて分子レベルでの議論が可能になる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a method to prepare supported lipid bilayers with simultaneous control of membrane protein orientation and lipid membrane asymmetry, and to observe the dynamics of membrane proteins whose function is related to lipid membrane asymmetry by high-speed AFM. By FY 2019, planar membranes were prepared on AFM substrates by the droplet contact method. Using a micromanipulator and a microinjector on the sample stage of a tip-scanning high-speed AFM, we were able to prepare a uniform lipid film on the AFM substrate. However, there was a problem that the optical system of the tip-scanning high-speed AFM was unstable. Therefore, in FY2021, we replaced the tip-scanning high-speed AFM with a more stable sample-scanning high-speed AFM and adjusted it to a level where it could operate stably.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 非対称膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜中には様々な膜タンパク質や脂質が不均一に存在する。例えば膜平面方向の不均一性は、異種または同種の膜構成分子が膜中で集合・分散しながら機能するというラフトの概念が代表的である。また、膜垂直方向に関しても不均一である。生体膜を構成する脂質二重膜の内側と外側の脂質組成は異なっており、非対称な脂質組成が膜タンパク質の活性、膜変形、シグナル伝達等に重要であることが知られている。

高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)は、基板上に置かれた膜タンパク質の構造変化や膜中での集合・分散動態をナノスケールで観察することができる。これまでに、様々な再構成膜中の膜タンパク質の構造変化(Shibata, M. et al. *Nat. Nanotech.* 2010)や集合・分散動態(Sumino, A. et al. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014)が HS-AFM によって可視化され、脂質 - 膜タンパク質間相互作用や膜タンパク質間相互作用について新しい情報をもたらしてきた。その一方で、HS-AFM は AFM 探針が面する面しか観察できない。よって、基板上的再構成膜タンパク質の配向を制御することが重要であり、申請者らは近年その方法を開発した(Sumino, A. et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2017)。しかし、膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性を同時に制御した再構成膜を AFM 基板上に構築することは出来ていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性を同時に制御した固定化平面膜の調製法を開発し、脂質膜の非対称性が機能に関わる膜タンパク質の動態を高速 AFM 観察することである。AFM 基板上での膜タンパク質の配向と脂質膜の非対称性の同時制御ができれば、膜タンパク質の機能動態に及ぼす脂質の非対称性の影響などについて分子レベルでの議論が可能になる。

### 3. 研究の方法

細胞膜のように裏と表で異なる脂質組成からなる非対称脂質二分子膜を構築するには、水と油の界面に形成した脂質単分子膜を二枚張り合わせる、液滴接触法が有用だと考えた。ここで、張り合わせる二枚の脂質単分子膜の組成が同じ場合は対象膜になり、異なれば非対称膜になる。AFM 観察には、試料サイズの制限がなく、また試料基板近傍の空間が広い探針走査型高速 AFM を使うことにした。それによって、ガラスピペット等による液滴の操作を高速 AFM の試料基板上で行いやすくなるためである。しかし、4. 研究成果に記述した経緯によって、探針走査型高速 AFM 基板上での液滴接触膜の作製は中止し、より動作が安定している探針走査型高速 AFM に作り替えた。

### 4. 研究成果

2018 年度までに、原子間力顕微鏡観察に用いるマイカ基板およびガラス基板上において、液滴接触法による対象脂質二分子膜の調製条件を検討したが、脂質薄膜の調製の再現性が低く、基板上に均一に蛍光分子が分布することは少なかった。2019 年度は光学顕微鏡下でマイクロマニピュレーターとマイクロインジェクターを用い、液滴の添加操作の精度を上げることを試みた。試料チャンバーの脇にマイクロマニピュレーターを設置し、内部に緩衝液を充填したガラスピペットを固定した。ガラスピペットには空圧マイクロインジェクターを接続し、ガラスピペット中の緩衝液を少量ずつ排出できるようにした。ガラスピペットはガラス管をレーザープレーに

よって加熱・切断することで作製し、切断後に先端系が30マイクロメートル程度になるようにマイクロフォージで加工した。マイクロマニピュレーターとマイクロインジェクターの導入前と比較して蛍光色素付き脂質の蛍光が基板上で均一な分布になりやすくなり、薄膜調製の再現性が向上したと考えられる。上記の試料調製はすべて、探針走査型高速原子間力顕微鏡のステージ上での非対称平面膜作製法の検討結果であるが、探針走査型高速原子間力顕微鏡の光学系が不安定で、AFM観察が日常的に安定して行えないという問題点があった。よって2021年度は、これまで検討していた探針走査型高速原子間力顕微鏡を、より動作が安定している試料走査型高速原子間力顕微鏡に作り替え、安定動作できるレベルまで調整した。今後は、試料走査型高速原子間力顕微鏡の試料ステージで非対称平面脂質二重膜を調製する方法を検討する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 H. Yamamura, T. Hagiwara, Y. Hayashi, K. Ogawa, H. Kato, T. Katsu, K. Masuda, A. Sumino, H. Yamashita, R. Jinno, M. Abe, A. Miyagawa	4. 巻 6(47)
2. 論文標題 Antibacterial Activity of Membrane-Permeabilizing Bactericidal Cyclodextrin Derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 31831-31842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04541	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 L. Pupplin, D. Kanayama, N. Terasaka, K. Sakai, N. Kodera, K. Umeda, A. Sumino, M. Arin, W. Wei, H. Tanaka, T. Fukuma, H. Suga, K. Matsumoto, M. Shibata	4. 巻 13(46)
2. 論文標題 Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 54817-54829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssami.1c17708	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 A. Yurtsever, S. Das, T. Nishimura, R. Rodriguez, D. Hirose, K. Miyata, A. Sumino, T. Fukuma, K. Maeda	4. 巻 57(92)
2. 論文標題 Visualisation of helical structures of poly(diphenylacetylene)s bearing chiral amide pendants by atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12266-12269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc05341h	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 T. Komori, H. Satria, K. Miyamura, A. Ito, M. Kamiya, A. Sumino, T. Onshi, K. Ninomiya, K. Takahashi, J. Anderson, T. Uto, K. Kuroda	4. 巻 9(35)
2. 論文標題 Essential Requirements of Biocompatible Cellulose Solvents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Sustainable Chemistry & Engineering	6. 最初と最後の頁 11825-11836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssuschemeng.1c03438	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 S. Hosogi, Y. Marunaka, E. Ashihara, T. Yamada, A. Sumino, H. Tanaka, L. Puppulin	4. 巻 179
2. 論文標題 Plasma membrane anchored nanosensor for quantifying endogenous production of H2O2 in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors & Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 113077-113077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.113077	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 R. Fukuda, M. Saito, S. Shibukawa, A. Sumino, M. Nakano, T. Murakami	4. 巻 59 (15)
2. 論文標題 Urea-Assisted Reconstitution of Discoidal High-Density Lipoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1455-1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00075	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 A. Sumino, T. Sumikama, T. Uchihashi, S. Oiki	4. 巻 118(3)
2. 論文標題 Induced-Fit Pathway Accelerated Binding of Agitoxin-2 to A K+ Channel Imaged by HS-AFM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 236a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.11.1392	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 A. Sumino, T. Sumikama, T. Uchihashi, S. Oiki	4. 巻 5(7)
2. 論文標題 High-speed AFM reveals accelerated binding of agitoxin-2 to a K+ channel by induced fit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0495	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 M. Inada, M. Kinoshita, A. Sumino, S. Oiki, N. Matsumori	4. 巻 1059
2. 論文標題 A concise method for quantitative analysis of interactions between lipids and membrane proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2019.01.042	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 T. Noji, M. Matsuo, N. Takeda, A. Sumino, M. Kondo, M. Nango, S. Itoh, T. Dewa	4. 巻 122(3)
2. 論文標題 Lipid-Controlled Stabilization of Charge-Separated States (P+QB <sup>-</sup> ) and Photocurrent Generation Activity of a Light-Harvesting-Reaction Center Core Complex (LH1-RC) from Rhodospseudomonas palustris	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1066-1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.7b09973	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14件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 D. Mukai, Y. Zhao, M. Shibata, M. Hattori, A. Sumino
2. 発表標題 Structural Dynamics of The Cytoplasmic Domain of Transient Receptor Potential Vanilloid1(TRPV1) in Lipid Bilayer Observed by High Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM)
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田 幹大, 服部 素之, 角野 歩
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜中TRPV1 チャンネルの動態観察
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷 孫斗, 柴田 幹大, 上田 直子, 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるハブ毒液由来脂質分解酵素PLA2の膜認識機構の解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 Induced-Fit Pathway Accelerated Binding of Agitoxin-2 to A K+Channel Imaged by HS-AFM
3. 学会等名 米国生物物理学会第64回年会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角野 歩, 神谷 孫斗, 上田 直子
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるハブ毒液由来ホスホリパーゼA2の脂質膜分解動態の観察
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷 孫斗, 上田 直子, 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるリン脂質分解酵素の脂質膜分解動態の解析
3. 学会等名 日本生物物理学会 平成30年度中部支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 高速AFMによるサソリ毒ペプチドが効率的にK <sup>+</sup> チャネルを阻害する仕組みの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによる膜関連分子の動態観察
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 フォーラム (チュートリアル企画) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 High-Speed AFM reveals ligand binding dynamics on membrane proteins: Accelerated binding of agitoxin-2 to a K <sup>+</sup> channel by induced fit
3. 学会等名 Trends in Molecular Biophysics of Living Cells (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 Studying ion channels in reconstituted membrane using atomic force microscopy
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 原子間力顕微鏡のイオンチャネル研究への応用
3. 学会等名 第3回イオンチャネル研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるサソリ毒ペプチドとK <sup>+</sup> チャネルの結合動態解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 大輝, 後藤 朱音, 豊田 貴大, 角野 歩, 柴田 幹大, 古寺 哲幸
2. 発表標題 曲率を持った膜上のタンパク質の集合-解離現象の高速AFM 観察
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 実央, 福田 亮介, 角野 歩, 村上 達也
2. 発表標題 脂質/タンパク質ドラッグキャリアの1ステップ作製
3. 学会等名 第34回 日本DDS学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------