

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770173

研究課題名(和文)新規平面脂質膜を用いた細胞膜分裂装置divisomeの形成過程と構造の解明

研究課題名(英文)Development of novel type of flat lipid membrane for observation of complex formation process and structural analysis of divisome

研究代表者

奥野 貴士 (Okuno, Takashi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：膜分裂時には、複数の膜タンパク質が巨大な複合体を形成し、分裂を駆動する。しかし現在、複数の膜タンパク質で構成する巨大複合体の構築過程や構造解析を可能とする適当なモデル脂質膜は少ない。本研究は、大腸菌の内膜成分をもとにした平面脂質膜を開発し、巨大膜タンパク質複合体の構造解析を目的とした。その結果、標的膜タンパク質が平面膜に分配されないことがわかり、複雑な膜タンパク質複合体を解析可能なモデル膜開発を行った。その結果、ト培養細胞由来の細胞膜成分を数 $\mu\text{m}$ の範囲に基板上に展開出来ることを見いだした。開発したモデル細胞膜は、複雑な膜タンパク質複合体のイメージング解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：Many of membrane proteins are recruited at cell division site and drive the E. coli cell division. The membrane proteins interact with each other and forms huge protein complex named divisome. At present, fundamental mechanism of divisome formation and structure of the complex on cell membrane has not been clear. In this study, we developed a new model membrane, which can analyze a structure and functions of huge membrane proteins complex, and tried to reveal molecular mechanism of E. coli cell division. We succeeded in flat lipid membrane at liquid-air interface using E. coli extracted lipid. We prepared some GFP fusion membrane proteins, which drive cell division, and reconstituted into the model membrane. At the end of this study period, we could not find membrane protein into the model membrane. Recently, we developed a new method for preparation of cell membrane sheet derived from cultured cell. We will keep trying to analyze membrane protein complex by using the model membrane.

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学,生物物理学

キーワード：細胞膜 膜タンパク質の複合体

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の自己増殖は、生命の定義の一つに挙げられる重要な生命現象である。細胞が増殖する最終ステップにおいて、最も劇的に細胞形態が変わる。一つの母細胞は、細胞膜がくびれて、2つの娘細胞が誕生する。大腸菌の場合、細胞の分裂時の分裂面において、10種類以上の膜タンパク質が複合体を形成する非常に複雑なシステムで制御されている(下図)。

これまでの研究から、大腸菌の分裂に参与するタンパク質が同定され、個々の機能/構造について解明されてきた。しかし、それらタンパク

質が分裂面において複合体を形成する過程や構造については不明な点が多くあった。試験管内で膜分裂を制御するタンパク質を解析するためには、脂質膜に標的タンパク質を再構築する実験系が機能/構造解析に有効である。しかし、複数の膜タンパク質をモデル膜に再構築する技術は、未だに非常に困難を有し、10種類以上ものタンパク質を再構築した実験系の報告は無かった。その一方で、細胞膜に存在するタンパク質の機能解析の一つの手段として、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡などのイメージング技術が有効である。研究開始当初、複数の膜タンパク質のイメージング解析を可能とするモデル膜の報告は多くなく、複数の膜タンパク質を解析可能とする新たな解析のためのモデル膜が必要であった。

### 2. 研究の目的

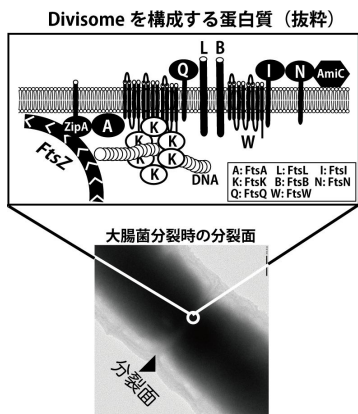
本申請研究の目的は、2つある。複数の膜タンパク質で構成される巨大な膜タンパク質複合体の構造、機能解析を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡でのイメージング解析を可能とする平面モデル脂質膜の開発。確立した平面モデル脂質膜を用いて細胞膜分裂を駆動する巨大膜タンパク質複合体の構造/機能解析である。

### 3. 研究の方法

#### 新たな平面モデル脂質膜の構築について

申請者らは大腸菌の抽出脂質を用いて、気-液界面に平面性の高いモデル脂質膜の作製方法を確立していた。研究期間においては、この平面脂質膜に大腸菌由来の内膜成分を再構築方法の開発を行った。

#### 大腸菌膜分裂装置の構造/機能解析



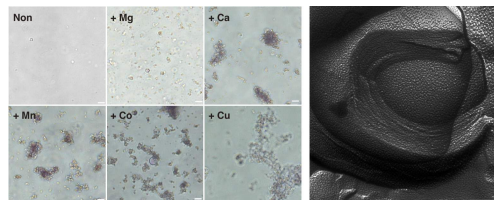
膜分裂時に分裂面には FtsZ, ZipA, FtsA, FtsK がリクルートされる。そこでこれらタンパク質の GFP 融合および蛍光標識を準備し、平面も出る膜上において複合体を再構築し、蛍光イメージング解析を試みた。

### 4. 研究成果

#### 新たな平面モデル脂質膜の構築について

大腸菌の抽出脂質を用いて気-液界面に平面脂質膜の作製を検討した。平面膜作製条件を検討した結果、以下の[1]~[2]のステップで平面膜を再現性良く調製する事に成功した(論文投稿準備中)。

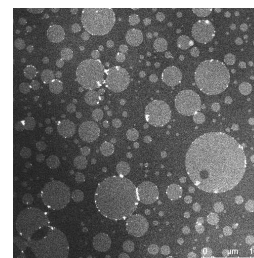
[1] 2価カチオン添加による巨大多重膜ベシクルの調製: 水合法により調製した大腸菌抽出脂質リポソーム(平均粒径 ~数百 nm) に2価カチオンを添加し、リポソームを凝集させる。凝集体では、脂質分子が無秩序に凝集しているのではなく、多重層を形成することを電子顕微鏡観察で明らかにする事に成功した。



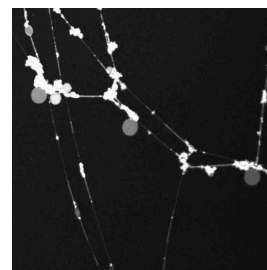
カチオン添加で形成された大腸菌抽出脂質リポソームの凝集体の顕微鏡写真

凝集体の電子顕微鏡写真

[2] 作製した脂質凝集体を低速遠心で精製し、新たな緩衝液に入れ、穏やかに拡散する。その結果、気-液界面にて脂質凝集体から脂質膜が広がる様に展開し、円状の膜構造体が形成される事を見いだした。FRAP 解析から脂質膜中の脂質分子は、リポソームと同程度の拡散定数 ( $1.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) を示し、膜中を分子が自由拡散する膜蛋白質の解析に優れたモデル膜である事が分かった。



また、脂質凝集体に EDTA を加え、溶液中の2価カチオンを添加すると凝集からチューブ状の脂質構造体が生じる事を発見した。これまでチューブ状の脂質構造体の作成方法は限定されており、新しいチューブ状の脂質構造体の作製方法を見いだした。



EDTA 添加により凝集体から生じたチューブ構造

以上より大腸菌の抽出脂質を用いて、気-液界面に蛍光イメージング可能な広い面積に平面脂質膜を準備する方法を確立した。次に、

この平面膜に大腸菌の内膜成分を再構築する事を検討した。

当初の計画とおり気-液界面にモデル脂質膜の作製条件を確立した。

#### 大腸菌膜分裂装置の構造/機能解析

次に大腸菌内膜成分より調製した反転膜と前記の膜凝集体を融合することで、大腸菌の内膜成分を気-液界面に再構築する事を検討した。

その結果、反転膜の脂質成分は気-液界面の脂質膜に取り込まれる事を明らかとした(右図)。

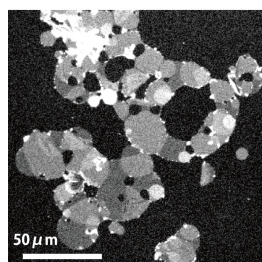
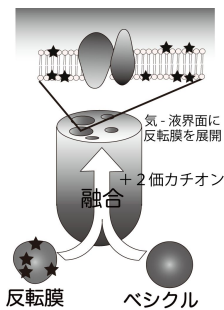
一方で、FtsZ-GFP、ZipA-GFP、FtsA-GFPおよびFtsKの発現系を構築し、それぞれの精製および膜タンパク質の場合は、反転膜の調製を行い、予定通り準備することが出来た。FtsZは、C末端に蛍光標識した状態での精製に成功した。ZipA-GFPおよびFtsA-GFPを含む大腸菌由来の反転膜と前述の脂質凝集体を混合し融合を行い、気-液界面の脂質膜への膜タンパク質の再構築を検討した。様々な融合条件での膜タンパク質の再構築を検討したが、脂質は平面膜に分配されるが、膜タンパク質の膜への移行を確認する事が出来なかった。膜タンパク質成分は、反転膜と脂質の凝集部分に蓄積した。今後、タンパク質の種類を変えることで、平面膜への移行を検討していく。また、気-液界面の平面膜の構造の詳細についての解析を液中AFM等で検証する必要がある、これについても続けて検証を行う。

#### [結論]

気-液界面への平面脂質膜構築に成功し、新しいモデル膜構築が出来た事から、申請研究の課題の約半分の目標を達成する事が出来た。しかし、実際の膜分裂装置の構造/機能解析にまで到達する事が出来ず、今後の課題として取り組んでいく。

#### <生じた問題の対処>

研究期間の2年目の終了時に、大腸菌反転膜中の標的膜タンパク質が平面膜に移行しない問題が生じた。そこで、膜タンパク質の巨大な複合体のイメージング解析を可能とする新しいモデル膜作製の検討を問題解決の実験と並行して進めた。当素、大腸菌の内膜由来の反転膜で検討を行って来たが、ヒト培養細胞の細胞膜を試薬添加により、10 μm程度の小胞状に試験管に切り出せる事を見



気-液界面に展開した反転膜の蛍光顕微鏡像

いだした。この方法は、1970年代にScottによりフォルムアルデヒド添加により作製出来る事が報告されていたが、界面活性剤や他の試薬を添加により、作製出来る事を見いだした(特許出願済み)。さらに、蛍光顕微鏡およびAFMでの観察に適する様に、小胞状の構造体をガラス基板上に展開した細胞膜シートの作製に成功した。この手法を用いることで、細胞膜中で複数の膜タンパク質が形成する複雑な構造体のイメージング解析が可能となった。今後、細胞膜シート中の膜タンパク質の構造/機能解析が期待出来る。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文]  
該当なし

[学会発表](計 6件)

(1) 南祐太, 飯沼博章, 櫻井敏彦, 奥野貴士: ベシクル状に切り出した細胞膜を基板上に展開する研究. 「細胞を創る研究会5.0」(東京), 2012.11

(2) 飯沼博章, 南祐太, 菅原有希, 上野雅晴, 櫻井敏彦, 奥野貴士: 界面活性物質を用いて細胞膜をベシクル状に切り出す研究. 「細胞を創る研究会5.0」(東京), 2012.11

(3) 南祐太, 飯沼博章, 櫻井敏彦, 奥野貴士, Development of a new method for preparation of cell membrane flat sheet on glass surface, 第51回日本生物物理学会年会, (京都), 2013.10

(4) 飯沼博章, 南祐太, 櫻井敏彦, 奥野貴士, Development of method for preparation of giant plasma membrane vesicles using surfactants, 第51回日本生物物理学会年会, (京都), 2013.10

(5) 南祐太, 飯沼博章, 櫻井敏彦, 奥野貴士, GPMVs由来細胞膜シートの物性評価と微細加工基板によるマニピレーション技術, 細胞を創る研究会6.0, (鶴岡), 2013.11

(6) 川畑智美, 南祐太, 櫻井敏彦, 奥野貴士, 細胞膜を試験管に取り出す方法, 細胞を創る研究会6.0, (鶴岡), 2013.11

[図書](計 1件)

Okuno T., Ogura T., FtsH Protease-Mediated Regulation of Various Cellular Functions. *Subcell Biochem.*, 66, 53-69 (2013).

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 動物細胞から細胞膜を切り出す方法、及び切り出された細胞膜

発明者: 奥野貴士、南祐太、小野寺美紀

権利者: 国立大学法人山形大学

種類: 特許

番号: 特許願 2013-228766号

出願年月日: 平成25年11月1日

国内外の別: 国内

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

奥野 貴士 (TAKASHI, Okuno)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031