

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710127

研究課題名(和文)無細胞たんぱく質合成系を用いた基板支持生体模倣膜の構築

研究課題名(英文)Fabrication of Solid-Supported Biological Membrane Models Using Cell-Free Protein Synthesis

研究代表者

片岡 知歩(浜井知歩)(Kataoka, Chiho)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・研究員

研究者番号：70443009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ベシクルフュージョンにより支持脂質膜を形成し、膜タンパク質の無細胞合成を用いて支持膜へのタンパク質導入が可能であるかを検討した。その結果、どの条件においても正しく折りたたまれた状態の膜タンパク質を支持膜中に存在させることはできなかった。また、支持脂質膜の性質は膜タンパク質の機能等に関わるため、支持膜の性質も研究対象にしていた。そこで、支持膜の分子密度と支持膜形成機構について研究を行った。その結果、支持膜の脂質分子密度がpHに応じて変化する現象を発見した。また、ベシクル開裂過程において膜欠陥が形成され、欠陥により支持膜形成が誘発される機構を発見した。

研究成果の概要(英文)：In this project, the reconstitution of transmembrane proteins in supported lipid bilayers using cell-free protein synthesis was investigated. Supported bilayers were formed by vesicle fusion, and then protein expression was conducted over these bilayer systems. However, protein folding in supported bilayers was not observed under any experimental conditions tested. The project also aimed at the investigation of properties of supported lipid bilayers because they affect the properties and functions of transmembrane proteins. It was found that the packing density of supported bilayers can change with solution pH. In addition, the defect formation mechanisms in supported bilayers were clarified.

研究分野：物理化学、表面科学

キーワード：生体膜 ベシクル 基盤支持脂質膜

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は物質輸送、エネルギー変換、細胞間伝達など、生命の維持に欠かすことのできない役割を担っている。固体基板に広げた平らな脂質膜に膜タンパク質を安定に導入することができれば、膜タンパク質の単分子蛍光観察等が可能となり、生物学的研究が大きく進展すると期待される。また、新規薬剤の開発において、膜タンパク質は最も重要な標的である。従って、膜タンパク質を安定に固体表面に存在させることができれば、膜タンパク質に作用する物質を迅速にスクリーニングすることが可能になると考えられる。

上述のように、膜タンパク質固定化技術の重要性は明白であるが、この分野は未だ発展途上にある。主要な原因は、膜タンパク質は正しく膜内に折りたたまれた状態にある場合にのみその機能を発現すること、また膜タンパク質の支持体となる脂質膜が流動性を持った非常に不安定な構造であること、の2つであると思われる。

固体表面上に広げた平面状の脂質膜(基板支持脂質膜)は、ベシクルフュージョンと呼ばれる方法で作製することができる。脂質二分子膜からなるベシクルを固体表面に吸着させ、自発的に開裂させることによって支持膜を形成させる方法である。この手法では、ベシクルを脂質のみで作製した場合には支持膜を簡単に形成できる場合が多いが、膜タンパク質を含むベシクルを用いると支持膜を形成させることが非常に困難となる。膜タンパク質を含むベシクルはその大きさやラメラリティが不均一である場合が多いこと、また膜タンパク質が表面に強く吸着してしまうことなどが原因である。

そこで本研究では、ベシクルフュージョンにより脂質のみから成る支持膜を形成し、膜上で膜タンパク質の無細胞合成を行うことにより、膜タンパク質の直接導入が可能であるかを検討することにした。また、支持脂質膜の性質は膜タンパク質の導入しやすさや機能等に関わるため、支持膜の性質も研究対象とした。

## 2. 研究の目的

本研究では始めに、大腸菌の outer membrane protein A (OmpA) を発現するプラスミドを用いて、無細胞合成により OmpA を支持膜に導入できるかどうかを検討した。OmpA は正しく折りたたまれた状態とそうでない状態を電気泳動によって分離できる。そこで、電気泳動を用いて支持膜中での膜タンパク質の状態を調べた。その結果、様々なパラメータを変化させて実験を行ったが、どの条件においても正しく折りたたまれた状態の OmpA を支持膜中に存在させることはできなかった。精製した OmpA を用いた実験等による検討から、溶液中で膜タンパク質が合成され支持膜に到達するまで

に、疎水性の膜タンパク質は凝集してしまい、凝集した状態のまま膜に吸着してしまうことが原因であると考えられた。様々な実験系を試みたが、この問題を解決する事はできなかった。

支持膜の性質に関する研究では、支持脂質膜の分子密度を明らかにする研究を行った。膜タンパク質の性質や機能は脂質膜の分子密度に大きく依存する。しかし以前の研究では、支持膜の分子密度に関する情報は得られていない。また、巨大ベシクルの吸着・開裂による支持膜形成機構を調べた。膜タンパク質を研究するための実験系として、巨大ベシクルから支持膜を形成する試みが行われている。従って、このような新規な実験系を発展させるためには、巨大ベシクル開裂を介した支持膜形成の機構を研究することが重要である。

## 3. 研究の方法

ベシクル(直径100ナノメートル)はエクストルージョン法により作製した。巨大ベシクル(直径数 数十マイクロメートル)は乾燥脂質膜の水和により作製した。支持膜の拡散定数は、蛍光修飾した支持膜に対して蛍光退色後蛍光回復測定により計測した。巨大ベシクルの吸着挙動や支持膜の分子密度変化は、蛍光顕微鏡と石英振動子測定を用いて調べた。また、支持膜の状態や固体基板表面の粗さを検討するため、原子間力顕微鏡を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 基板支持脂質膜の分子密度変化  
膜タンパク質の性質や機能は脂質分子の充填様式に依存する。従って、基板表面上に生体膜モデルを形成する際、支持膜の脂質密度は非常に重要なパラメータとなる。ところが、以前の研究では支持膜の分子密度に対して注意が払われてこなかった。

本研究では、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) 脂質から構成される支持膜の充填密度が pH に応じて変化することを見出した。分子密度変化は次に示すいくつかの現象により証明された。

始めに、ガラス上に形成された DOTAP 支持膜の拡散定数は、pH 上昇に伴い増加した。テキサスレッド標識脂質を用いた測定では、クエン酸緩衝液(pH 3.0)中での拡散定数は  $0.43 \pm 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、酢酸溶液(pH 4.0)中では  $0.71 \pm 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、リン酸緩衝液(pH 7.2)中では  $1.9 \pm 0.38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3)中では  $4.1 \pm 0.39 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であった。支持膜の拡散定数を報告している以前の研究では、拡散定数は溶液条件にはほとんど依存していない。従って、pH 3.0 と pH 8.3 との間で拡散定数が 10 倍も異なる現象は非常に珍しい。

拡散定数の pH 依存性の原因を調べるため、蛍光顕微鏡を用いて、ガラス表面への巨大ベ

シクルの吸着挙動を観察した。その結果、ベシクルが吸着・開裂して支持膜を形成後、pH8.3では支持膜の表面積が秒スケールで増加することが分かった。この結果から、pHが上昇すると脂質分子密度が減少するのではないかと考えた。この仮説を証明するため、さらに実験を行った。始めにpH3.0で支持膜の島を形成させ、溶液を交換してpHを8.3に変化させた。そして時間に対して支持膜の面積を計測したところ、支持膜の面積は $8.9 \pm 0.73\%$ 増大した。従って、pHがアルカリ性になると分子充填密度が減少する、と結論付けられる。

この分子密度変化は、拡散定数のpH依存性とよく一致する。すなわち、脂質密度が減少すると、次の理由により拡散定数は増加する。第一に、脂質分子間相互作用が減少するため、一分子が拡散に必要な活性化エネルギーが減少する。第二に、一分子が拡散に利用できる自由面積が増加するため、拡散の空間的確率が増加する。そして、本研究により計測された実験値と文献値を合わせて考えると、pH上昇に伴う拡散定数増加の主な原因は、活性化エネルギーの減少である、と結論付けられた。

上記の現象は、蛍光脂質を用いた蛍光顕微鏡測定により明らかにされた。そこで次に、蛍光で標識していない支持膜の分子密度変化はどのような現象により確認できるのか、について研究を行った。実験では、DOTAP支持膜を酸化シリコン表面へ吸着させ、その吸着挙動を石英振動子を用いて測定した。その結果、pH8.3での支持膜形成の際、エネルギー損失項(D値)が増加することが分かった。以前の研究では支持膜のD値はゼロに近いと報告されており、D値の増加は未報告の現象である。モデルへのフィッティングの結果から、支持膜分子密度の増加によりD値が増加した、と結論付けた。

本研究は、基板表面との相互作用により脂質膜の分子密度が変化する現象を初めて明らかにした。支持膜は生体膜のモデルとして幅広く利用されている。従って、固体表面に吸着することにより脂質膜のどの性質がどの程度変化するかを把握することは非常に重要である。本研究では、正に帯電したDOTAP脂質に対して支持膜の密度変化を発見した。一方、生体膜の主成分は電荷を持たない脂質や負に帯電した脂質である。従って今後、生体膜の主要脂質から構成した支持膜の分子密度を研究したい。

## (2) 欠陥形成が誘発する支持膜形成機構

生体膜のモデルとして支持膜を利用する際、穴の開いた基板の上に支持膜を形成する試みが行われている。穴を持つ基板表面を平らな脂質膜で覆うと、穴の上の脂質膜は溶液中に浮かんだ状態となる。この領域では固体基板の影響を無視できるのに加え、上下の溶液空間を利用し脂質膜を介した物質輸送を測

定することができる。このような系を作製する際、直径が数 数十マイクロメートルの巨大ベシクル1つを吸着・開裂させて支持膜を形成する試みが行われている。この理由は、直径が数百ナノメートルの小さなベシクルを吸着させると、支持膜に多数の膜欠陥が生じてしまい、基板の穴をうまくふさぐことができないためであると考えられる。ところが、一つの巨大ベシクルを開裂させて支持膜を形成させる際、膜欠陥が生じることはないであろうか？この問いに答える研究は行われていない。そこで本研究では、巨大ベシクル開裂に伴う膜欠陥形成機構を研究した。

蛍光顕微鏡を用いた実験により、ガラスに吸着した巨大ベシクルの吸着領域に膜欠陥が生じ、欠陥が生成することによってベシクル開裂が誘発され支持膜が形成される過程を見出した。このような欠陥誘発型のベシクル開裂の割合は塩濃度に依存することが分かった。特に、負に帯電したベシクルが生体的条件下で開裂する際、約4割の支持膜が膜欠陥を含んでいた。生体膜の多くは負に帯電しているため、巨大ベシクルの開裂を利用して穴を持つ基板の上に生体膜モデルを作製する際には注意が必要であると考えられる。

## 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2件)

片岡 知歩、山崎 智彦、"Induced Rupture of Vesicles Adsorbed on Glass by Pore Formation at the Surface-Bilayer Interface", *Langmuir*, 査読有、Vol. 31、2015、pp. 1312-1319、DOI: 10.1021/la5042822

片岡 知歩、樋口 麗保子、"Packing Density Changes of Supported Lipid Bilayers Observed by Fluorescence Microscopy and Quartz Crystal Microbalance-Dissipation", *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有、Vol. 118、2014、pp. 10934-10944、DOI: 10.1021/jp503905r

[学会発表](計3件)

片岡 知歩、「ガラスに吸着したベシクルの開裂：吸着領域での孔形成が誘発する機構」、日本化学会 第95春季年会、2015年3月26 - 29日、日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県・船橋市)

片岡 知歩、山崎 智彦、「吸着ベシクルの開裂機構：吸着領域での欠陥孔形成が関わる機構」、第62回 応用物理学会春季学術講演会、2015年3月11 - 14日、東海大学湘南キャンパス(神奈川県・平塚市)

片岡 知歩、「基板支持脂質膜の分子密度変化」第65回コロイドおよび界面化学討論会、2014年9月3 - 5日、東京理科大学（東京都）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 知歩 (KATAOKA, Chiho)

物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク  
トニクス研究拠点・研究員

研究者番号：70443009