

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06667

研究課題名(和文)ドメインを有する繋ぎ止め脂質二重膜の構築と膜タンパク質研究への応用

研究課題名(英文) Construction of tethered lipid bilayer with domain and its application to membrane protein research

研究代表者

茂木 俊憲 (MOTEGI, TOSHINORI)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：00780602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：基板上に形成した人工脂質膜(SLB)は、その二次元性から膜タンパク質の分子構造等の理解に役立つ。一方で基板との接触による構造変形や配向性の欠如が膜タンパク質研究において障害となっている。基板との接触を低減し、膜タンパク質を特定配向で固定化することが必要である。本研究では、平坦なマイカ上に、膜タンパク質の特定部位に結合する自己組織化単分子膜(SAM)を作成し、その上にSLBを形成した。膜外領域の大きさが上下で異なる膜タンパク質の分子サイズ計測からその配向が揃ったことを確認した。膜タンパク質の不活性化を低減し、特定配向の膜タンパク質の構造解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)：The artificial lipid membrane (SLB) formed on the substrate is useful for understanding the molecular structure of membrane proteins from its two-dimensional nature. On the other hand, structure deformation and lack of orientation due to contact with the substrate are obstacles in membrane protein research. It is necessary to reduce contact with the substrate and immobilize the membrane protein in a specific orientation. In this study, self-assembled monolayer (SAM) binding to a specific site of membrane protein was formed on flat mica, and SLB was formed thereon. It was confirmed that the orientation was aligned from the measurement of the molecular sizes of the membrane proteins with different extracellular domains on the top and bottom. Inactivation of membrane proteins can be reduced and structural analysis of membrane proteins with specific orientation has become possible.

研究分野：物理化学

キーワード：脂質二重膜 原子間力顕微鏡 蛍光顕微鏡 膜タンパク質 自己組織化単分子膜 マイカ

1. 研究開始当初の背景

主要な創薬の標的である膜タンパク質を人工平面脂質二重膜に組み込むことは、分子レベルの計測に基づいた生体膜内で起こる反応の機構解明につながるため重要である。しかし、固体基板に直接支持した脂質膜 (supported lipid bilayer: SLB) を用いる場合、膜タンパク質-基板間の接触による構造変化と膜タンパク質配向の無秩序性が大きな障壁になる。これまで物理化学の分野で膜タンパク質の組み込みについて研究がなされてきたが、膜タンパク質の可塑性や多様性を重要視しつつ、分子レベルでの詳細な計測を達成した報告は少なかった。研究代表者はこれまでに基板と人工膜間での相互作用および人工膜ドメインの物性計測についての知見を有していた。新たに膜タンパク質の抽出・精製・再構成技術をあわせて行うことで、物理化学に立脚した生体膜構造の理解を深めるだけでなく、膜タンパク質の構造・機能・反応解析のための基盤技術の創出が可能になると期待した。

2. 研究の目的

人工平面膜を用いて膜タンパク質を対象とした研究を行う上では、以下の問題を解決する必要があった。まず、膜内に組み込まれる膜タンパク質は基板表面との接触によって、立体構造が変形し活性を失う。さらに、生体膜内に存在する場合と同様に、膜タンパク質の向きをそろえて人工膜に組み込むことは難しい。また人工膜系でのドメイン形成については、膜を構成する複数の脂質分子の構造が大きく異なる場合、また基板と脂質膜の強い相互作用が存在する場合など、限られた条件において形成される。そこで本研究では、繋ぎ止め脂質二重膜 (tethered bilayer lipid membrane: t-BLM) の構築を目的とした (図1)。t-BLM は基板と脂質膜の間に、アルキル鎖を有する自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer: SAM) や高分子からなるクッション層を挟んだ構造である。この t-BLM に対して、申請者のこれまでの研究成果に基づいて表面平坦性・ドメインを付与するだけでなく、配向を制御した膜タンパク質の組み込みに適した新たな t-BLM の構築を行うこととした。将来的に、様々な膜タンパク質の活性を生体膜内と同様の条件下で測定する、創薬スクリーニングのための汎用的な基盤構築を目指した。

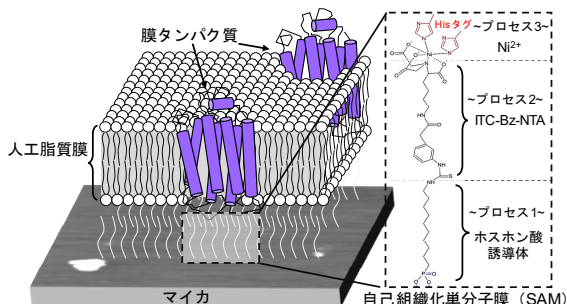


図1. 基板に繋ぎ止められた人工脂質膜。

3. 研究の方法

(1) 平坦で均一な表面を持つ分子修飾基板の作製: 原子レベルで平坦なマイカ基板上にて、タンパク質配向をそろえるため、SAMの作製を行った。これまで t-BLM が構築されてきた数 nm の凹凸を持つシリコン酸化物基板や金薄膜に比べて原子単位で平坦なマイカ基板を用いることで、一般的な大きさが数 nm 程度の膜タンパク質の明瞭な分子検出が可能になると考えた。まず、末端にアミノ基を有するホスホン酸誘導体をマイカ基板と反応させる。次にイソチオシアノベンジルトリロ三酢酸 (ITC-Bz-NTA) との反応により末端に Ni キレート構造を持つ SAM を構築することにした。ホスホン酸誘導体は水溶液中で安定に分散する特徴を有している。また、最終的に Ni^{2+} を ITC-Bz-NTA に配位させることで、ヒスチジン残基を末端領域に標識した膜タンパク質を特定配向で基板上に固定することができると考えた。それぞれの反応条件は報告されているが、凝集・欠陥構造のない均一な単層 SAM 形成条件を基板浸漬時間・温度・溶液濃度に基づき検討した。それぞれの反応段階において形成した SAM は、大気中 AFM 観察および角度分解 XPS 測定から、表面構造および分子結合状態を評価した。

(2) 分子修飾基板上での人工脂質膜 (t-BLM) の形成: 上記の分子修飾マイカ基板に対し、これまで研究代表者が行ってきたベシクル融合法により、単層脂質二重膜を作製することにした。この方法では、基板とベシクル間の相互作用により、ベシクルが開裂、脂質膜断片が形成、膜断片の融合を経て二分子膜が形成する。まず、マイカ基板上での均一な人工膜形成条件を確立する必要があった。用いる水溶液、脂質種類および反応温度と時間をパラメータとして、均一な人工膜の形成条件を決定した。この実験条件をもとに、分子修飾基板上に t-BLM を作製し、その均一性、膜の流動性を研究室が所有する AFM および蛍光顕微鏡観察から評価した。

(3) t-BLM への膜タンパク質再構成: 生体膜内では捉えることが困難な膜タンパク質の構造と活性発現との直接的な関連を明らかにするために、t-BLM への膜タンパク質組み込みを行った。本研究では、海洋性細菌中に存在し、光駆動プロトン輸送機能を示すプロテオロドプシン (pR) を膜タンパク質として使用した。カルボキシ末端 (C 末端) に His タグ標識した pR は大腸菌 (BL21(DE3)) を用いて発現し、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製を行った。得られた pR は界面活性剤 *n*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) を用いて水溶液中に可溶化した。まず、pR と脂質との混合比が 1:150 程度の割合になるように脂質ベシクル懸濁液と pR 可溶化溶液を混合することで、pR が脂質ベシクルに組み込まれた再構成ベシクル懸濁液を作製した。その後、bio-beads SM2 を溶液に添加し、10 時間程度の攪拌およびインキュベーション

により DDM を除去した。得られた pR 再構成脂質ベシクルは孔径 200 nm の PTFE フィルター抽出により粒径をそろえ、その溶液濃度を 0.3 mM 程度とした。次に、マイカ基板および分子修飾基板を pR 再構成脂質ベシクル懸濁液に浸漬し、45°C、1 時間のインキュベーションにより人工脂質膜を形成した。人工脂質膜内に添加した蛍光色素脂質 (Rb-DOPE) を蛍光顕微鏡により観察することで、均一性と流動性を評価した。液中 AFM 測定から、人工膜内の膜タンパク質 pR の膜外領域の高さを計測した。また、膜タンパク質の構造安定化への寄与が示唆されている脂質種からなるドメインを t-BLM 内に形成することを目指した。

4. 研究成果

(1) 分子修飾基板の作製: 図 2 にホスホン酸誘導体からなる SAM、ITC-Bz-NTA 反応後および Ni²⁺反応後の大気中 AFM 表面形状像を示す(図 2a)。それぞれの表面修飾プロセスにおいて、凹凸が 1 nm 以下の平坦な基板表面を得ることに成功した。また、角度分解 XPS スペクトル測定から、それぞれの分子修飾プロセスにおけるマイカ表面の分子種同定および結合状態を評価した。ホスホン酸誘導体反応後の XPS スペクトルではホスホン酸誘導体末端の-NH₃⁺由来のピークが N1s 領域に観測された(図 2b, 左)。また、ITC-Bz-NTA 反応後には、-NCO 由来のピークが N1s 領域に観測され、さらに Ni²⁺と反応後には Ni2p 領域にピークが観測された(図 2b, 中央)。これらの XPS スペクトル測定結果と AFM 形状測定結果から、マイカ基板上に 2 種類の分子層が積層し、最終的に Ni²⁺が配位していることを示すことができた(図 2b, 右)。以降では、この分子修飾基板に対して脂質ベシクル融合法により人工脂質膜を作製した結果を示す。

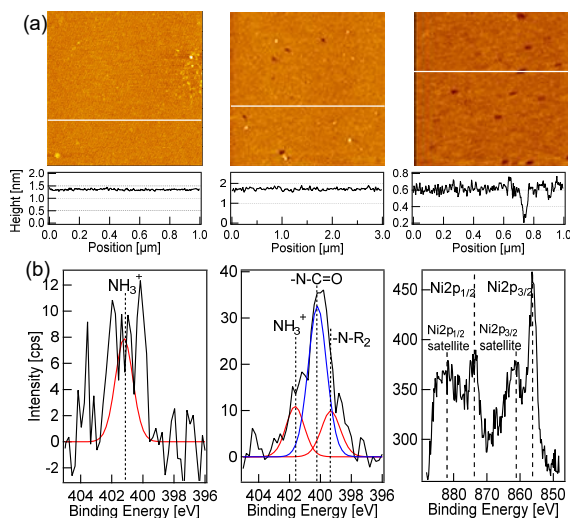


図 2. それぞれのマイカ基板分子修飾プロセスにおける計測結果. (a)AFM 形状像. (b)角度分解 XPS スペクトル測定結果. それぞれ、(左)ホスホン酸誘導体反応後、(中央)ITC-Bz-NTA 反応後、(右)Ni²⁺反応後の結果.

(2)分子修飾基板上での人工脂質膜の形成:図 3a に分子修飾基板を用いた場合における、脂質 POPC からなる SLB を作製し、蛍光退色後回復(FRAP)計測を行った結果を示す。蛍光色素分子として、脂質に対して 0.2 mol% の Rhodamine-DOPE を導入している。

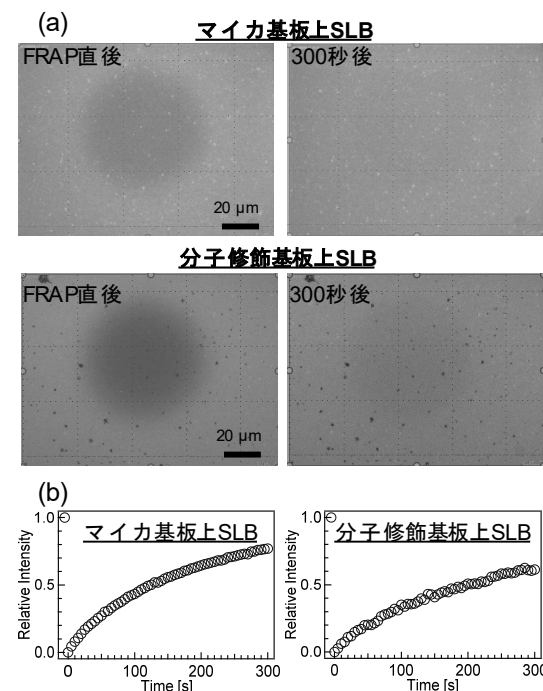


図 3. (a)脂質 POPC からなる人工脂質膜の落射蛍光顕微鏡観察下における FRAP 結果.

(b)観察像から得た蛍光回復曲線.

FRAP 法では、まず任意領域に強い励起光を照射し、蛍光分子を不可逆的に退色させる。退色した蛍光分子が分子拡散により周囲色素分子と入れ替わることで蛍光強度が回復するため、脂質分子の拡散に由来する脂質膜の流動性を判断することが可能である。また、半径 r の円形である蛍光退色領域の総蛍光強度を経時的に計測し、図 3b の蛍光回復曲線を得た。これに対して、以下の式(1)を用いて近似することで、膜内分子拡散性の指標である拡散係数 D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]を算出した。

$$D = 0.224 r^2 / t^{1/2} \quad \dots \text{式(1)}$$

ここで、 $t^{1/2}$ は蛍光強度が光退色前の蛍光強度の 50%まで回復するのにかかる時間[秒]である。まず、SAM のないマイカ基板上 SLB においては、式(1)に基づいて算出した D は $2.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。これに対し、SAM 修飾マイカ基板上の SLB においては、 $D=2.70 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。SAM 修飾することにより、 D が増加する結果が得られた。脂質膜と下部基板との間の摩擦係数は膜と基板の間に存在する水層の厚さに反比例する。本研究ではマイカ上の SAM の存在により、マイカと SLB との間に存在する水層の厚さが増加したことで、摩擦等の相互作用が低減した結果、SLB の流動性が増加したと考えられる。

(3) 分子修飾基板上での人工脂質膜の形成 pR を再構成した脂質 POPC からなる人工脂質膜における FRAP 結果を図 4 に示す。どち

らの基板を用いた場合でも蛍光強度が回復したことから、流動的な人工脂質膜を一様に形成することに成功した。また、拡散係数を算出すると、マイカ基板上の pR 再構成人工脂質膜では $D=2.3$ と算出された(図 3, 上段)。一方で、分子修飾基板上では $D=0.8$ と算出され、拡散速度が低下した(図 3, 下段)。細胞膜では膜タンパク質が膜下部のアクチン線維やスペクトリン等の膜骨格に結合することで拡散障壁となり、その他の膜内分子の拡散速度を低下させることが知られている。本実験で構築した分子修飾基板の場合、膜タンパク質 pR が基板上的 SAM と His タグを介して結合することで拡散障壁となり、膜内の蛍光分子拡散を阻害していると考えられる。

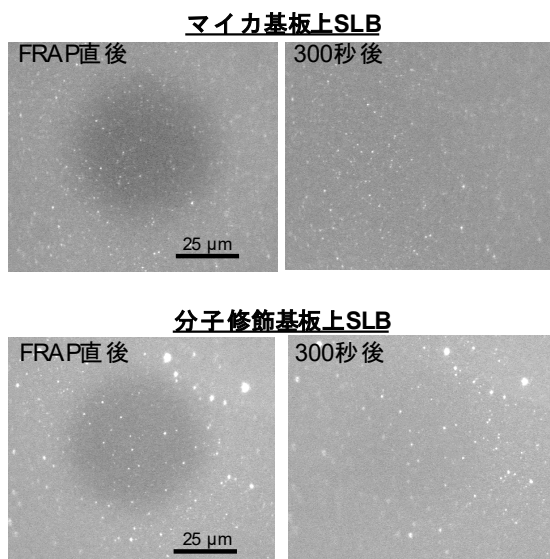


図 4. それぞれの基板上に形成した pR 再構成人工脂質膜の落射蛍光顕微鏡観察下における FRAP 結果. (上段)マイカ基板、(下段)分子修飾基板を用いた場合の結果.

(3) 膜タンパク質の配向観察: 次いで、人工脂質膜内での膜タンパク質の配向を液中 AFM 測定から評価した(図 5)。また、液中 AFM 測定においては、ばね定数の小さい探針を使用した。まず、マイカ基板上の人工脂質膜では、欠陥からの高さから脂質膜の厚さが 4.5 nm 程度であることがわかった。pR の配向性を調べるため測定範囲を縮小し測定を行った結果、1.3 nm および 0.8 nm の高さを持つ微小構造が観察された(図 5a)。この高さは脂質膜に pR が埋め込まれた際の N 末端側および C 末端側の膜外領域の高さと同程度であった。また、どちらの高さの構造も同程度の頻度で観察されたことから、この微小構造は pR に由来するものであり、マイカ基板上では人工脂質膜に pR が無秩序な配向で再構成されたといえる。一方で、分子修飾基板の場合では、0.8 nm の高さを持つ微小構造が高い頻度で観察された(図 5b)。本研究で用いた pR はその C 末端側に His タグを標識しているため基板に対して膜タンパク質が結合することにより、N 末端側の膜外領域に由

来する高さの構造が高い頻度で観察されたといえる。

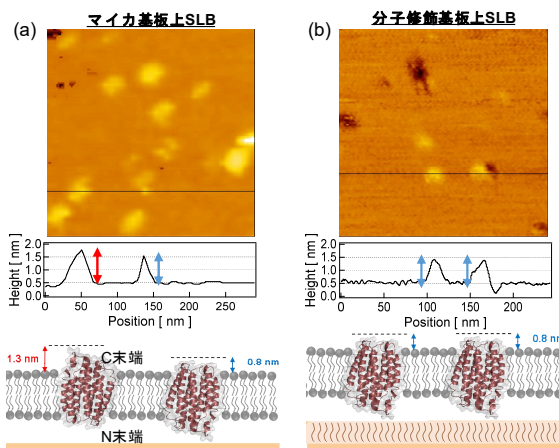


図 5. pR 再構成人工脂質膜の AFM 観察結果と膜内 pR 配向の模式図. (a)マイカ基板、(b)分子修飾基板を用いた場合の結果.

今後より多くの AFM 観察結果に基づき、人工脂質膜内に再構成した膜タンパク質由来の構造高さについて統計的に評価を行うことで、構築した t-BLM の膜タンパク質研究への有用性を示す。

(4) 人工膜内におけるドメインの形成

生体膜では特定の脂質や膜タンパク質が集合したドメインと膜タンパク質活性との関連が重要である。通常、ドメインは脂質分子の疎水性尾部の構造や親水性頭部の電荷の違いにより形成される。しかしドメインへの膜タンパク質局在化を起こす因子については不明な点が多い。そこで、人工脂質膜内の負電荷脂質 DMPG ドメインが及ぼす膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)活性および膜内分布への影響を調べた。天然紫膜中 bR の周囲には負電荷脂質が多く存在しているため、人工膜ドメインへの局在性が期待された。また分光測定から bR 光機能中間体の計測が可能であることから、従来の膜物性計測に関する研究に加え、膜タンパク質研究に役立つ知見を与えることができる。まず、マイカ基板上の DMPC:DMPG (1:1) SLB に蛍光標識 bR を導入し、液中 AFM 観察結果を図 6a に示す。1 nm 程度高さの異なる領域が共存した膜表面が得られたことから、DMPG 由来ドメインが形成したといえる。また、図 6b に示した分光計測により、DMPG の割合増加に従い、天然状態に近い bR 光機能中間体の生成および減衰挙動が見られた。また、FRAP 測定から、蛍光標識 bR は DMPG 由来ドメインの存在により、分子拡散性が低下することが分かった。以上のことから、DMPC:DMPG (1:1) SLB においては、DMPG ドメインが bR 周囲に存在していることが示唆された。今後は各 DMPG 濃度の SLB にて膜内 bR 拡散性を高い時空間分解能で評価するとともに、ドメインと bR 分布との関連を AFM により直接評価することでドメインが及ぼす bR 活性および分布への効果を解明する。

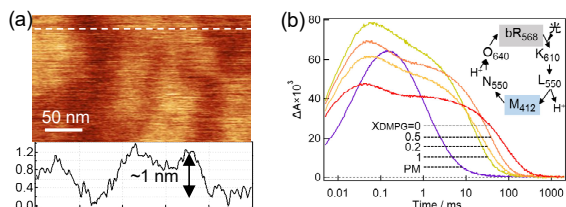


図 6. (a) DMPC:DMPG (1:1) SLB の AFM 計測結果. (b) DMPC DMPG ベシクル中での bR 光機能 M 中間体の生成・減衰による吸光度変化. (inset: bR の光サイクルと各中間体吸収波長)

本研究では、基板上に形成した人工脂質膜内の膜タンパク質と下部基板との直接的相互作用を低減させ、膜タンパク質の配向をそろえることを目指した。His タグ標識膜タンパク質と特異的に結合する官能基を有する SAM をマイカ基板に形成し、AFM および角度分解 XPS スペクトル測定から平坦な分子修飾表面の形成を評価した。また、膜タンパク質 pR を再構成した人工脂質膜を形成し、膜流動性測定に基づいて pR と His タグを介した SAM との結合形成を示した。さらに、液中 AFM 観察から、膜内 pR の膜外領域に由来する高さを解析した結果、分子修飾により膜タンパク質配向を揃えることに成功したと考えている。一方で、人工膜内ドメインおよび膜タンパク質の局在化については、特に分子拡散性計測が不足し、ドメインと膜タンパク質との相互作用を定量解析するに至らなかった。今後一分子計測技術を活用してドメインへの局在化因子を特定し、様々な膜タンパク質系へと応用することで、迅速かつ確実な新規膜タンパク質、これに作用する薬剤の発見やその反応機構解明が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① **T. Motegi**, K. Yamazaki, T. Ogino, R. Tero "Substrate-Induced Structure and Molecular Dynamics in a Lipid Bilayer Membrane." *Langmuir*, **33**, 14748–14755, (2017) (査読あり).

② R. Tero, K. Fukumoto, **T. Motegi**, M. Yoshida, M. Niwano, A. Hirano-Iwata "Formation of Cell Membrane Component Domains in Artificial Lipid Bilayer." *Sci. Rep.*, **7**, 17905, (2017) (査読あり).

③ Y. Okamoto, **T. Motegi**, K. Morita, T. Takagi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, R. Tero "Lateral Diffusion and Molecular Interaction in a Bilayer Membrane Consisting of Partially Fluorinated Phospholipids." *Langmuir*, **32**, 10712–10718, (2016) (査読あり).

[学会発表] (計 12 件)

① **T. Motegi**, H. Asakawa, S. Matsui, K. Shimizu, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, M. Sonoyama "Interaction of Protein and Lipid Molecules in the Supported Lipid Bilayer Membrane." fourth edition of

Scanning Probe Microscopy on Soft and Polymeric Materials (SPMonSPM 2018), 2018 年 8 月 22 日, ベルギー・ルーベン

② **茂木俊憲**, 星野弘行, 坂本広太, 林史夫, 園山正史 "表面修飾基板上の人工脂質膜の物性評価と膜タンパク質再構成系への応用." M&BE 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会, 2018 年 6 月 5 日, 仙台・作並温泉 湯の原ホテル

③ **T. Motegi** "Construction of Artificial Plasma Membrane Model and Elucidation of Functional Structure at Single Molecule Level." NTT 物性科学基礎研究所 分子生体機能研究グループ セミナー, 3 月 7 日, 厚木・NTT 物性科学基礎研究所

④ **T. Motegi** "Interaction of Protein and Lipid Molecules in the Supported Lipid Bilayer Membrane." Gunma International Symposium 2018 on Membranes, 2D Matters and Device Applications (GIS2018), 2018 年 1 月 17 日, 桐生・桐生地地域産業振興センター

⑤ **茂木俊憲** "超解像 FM-AFM 計測による人工膜内膜タンパク質結晶の観察." 第 6 回 バイオ AFM 夏の学校, 2017 年 8 月 26 日, 金沢・金沢大学

⑥ **T. Motegi**, H. Hoshino, M. Sonoyama "Formation of self-assembled monolayer composed of amino terminal phosphonic acid on mica substrate available to supported lipid bilayer system." 第 54 回 応用物理学会 春季 学術講演会 (English Session), 2017 年 3 月 16 日, 横浜・パシフィコ横浜

⑦ **T. Motegi**, R. Tero, T. Takagi, H. Takahashi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama "Investigation of fluorescence emission from dye-lipid in partially fluorinated lipid bilayer." 第 54 回 日本生物物理学学会大会, 2016 年 11 月 25 日, つくば・つくば国際会議場

[図書] (計 2 件)

① **茂木俊憲**, 星野弘之, 坂本広太, 林史夫, 園山正史 "表面修飾基板上の人工脂質膜の物性評価と膜タンパク質再構成系への応用." *Molecular Electronics and Bioelectronics 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会会誌*, **29**, 98-101, (2018)

② **茂木俊憲** "固体基板が及ぼす人工脂質膜物性への効果." *コロイドおよび界面化学部会 ニュースレター*, **41**, 19-20, (2016)

[その他]

ホームページ等

<http://biomolsci.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 俊憲 (TOSHINORI MOTEGI)

群馬大学大学院・理工学府・分子科学部門・助教

研究者番号: 00780602