

令和元年5月30日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19528

研究課題名(和文)蛋白質の膜透過の力を測る

研究課題名(英文) Measuring force generated by membrane translocation of protein

研究代表者

春山 隆充 (Haruyama, Takamitsu)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員

研究者番号：10792202

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)：基本的な生命現象の一つである蛋白質の膜透過の力を高速原子間力顕微鏡(高速AFM)で測ることが本研究の目的である。初めに、蛋白質膜透過チャンネルをナノディスクに再構成することで、膜透過反応の力学的特性を高速AFMで評価する系を構築した。測定系を構築する過程で、膜蛋白質を二方向から高速AFM観察する方法を発見し、新たな手法として査読付き学術誌に報告した。蛋白質の膜透過の力を測定するために必要な測定系と試料の準備が整ったので、今後、蛋白質の膜透過の力の測定を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の膜透過はすべての生物における必須の生命現象であり、蛋白質の膜透過の力を測ることでその力学的特性を評価することは、蛋白質の膜透過機構の解明につながる。今回、蛋白質膜透過チャンネル・ナノディスク・高速原子間力顕微鏡を用いて構築した測定系は、蛋白質の膜透過の力を測ることを可能にする。また一方で、その過程で発見した膜蛋白質を二方向から高速原子間力顕微鏡で観察する手法は、様々な膜蛋白質の構造変化の可視化に応用でき、膜蛋白質の機能の解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to measure the force generated by membrane translocation of protein which is one of the essential biological process by high-speed atomic force microscopy (high-speed AFM). First, we constructed a system to evaluate the mechanical properties of the membrane translocation reaction using high-speed AFM by embedding the protein-conducting channel into nanodiscs. In the process of constructing a measurement system, we discovered a method for high-speed AFM observation of membrane proteins from different orientations, and this work was published in a peer-reviewed journal as a new method. Now that the measurement system and sample necessary for measuring the force generated by membrane translocation of protein have been prepared, we will measure the force using high-speed AFM.

研究分野：生物物理

キーワード：高速原子間力顕微鏡 膜蛋白質 ナノディスク

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の膜透過は、すべての生物に保存された基本的な生命現象の一つである。蛋白質の膜透過反応について、Sec 蛋白質群が蛋白質の膜透過に関わることが「シグナル仮説」をはじめ数多くの研究から確かとなった。また、いくつかの研究室が Sec 蛋白質の結晶構造を報告し、静的な構造情報に基づく機能解析が進められ、Sec 蛋白質の機能ユニットが明らかになりつつある。これにより、反応最小ユニット（1 ユニット）での解析が可能となり、1 ユニットを用いた蛋白質の膜透過反応の動的メカニズムや力学的特性の解明に向けた研究へ今後シフトすると予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「蛋白質の膜透過の力を測る」ことである。

モデル生物である大腸菌などの原核生物では、膜透過反応は、蛋白質膜透過チャネルである SecYEG 複合体を介して起こり、モーター蛋白質である SecA ATPase が基質蛋白質と相互作用しながら、ATP 加水分解を伴う構造変化をすることで駆動される。この反応は、基質が unfold した蛋白質で不安定であることや SecYEG 複合体と SecA ATPase が過渡的な複合体を形成することなどから、1 ユニットを用いた解析が遅れている。

そこで、本研究では SecY-SecA の融合蛋白質とナノディスクシステムを用いて安定な 1 ユニットの構築し、高速原子間力顕微鏡と組み合わせることで、蛋白質の膜透過の力学的特性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 各蛋白質の調製

蛋白質の膜透過の力を測定するためには、Sec 蛋白質のオリゴマー状態を制御する必要がある。SecY-SecA 融合蛋白質を利用して SecYEG-SecA 複合体を調製する。SecYEG-SecA 複合体は蛋白質の膜透過活性を保持しており、この複合体をナノディスクに再構成する。基質となる蛋白質には、外膜蛋白質 OmpA の前駆体（シグナル配列の切断前）である proOmpA を用いる。proOmpA は、大腸菌内で過剰発現させて封入体から変性剤である Urea によって可溶化し、unfold の状態を保ったまま精製することで、proOmpA を紐状のポリペプチド鎖の状態を得ることができる。また、カンチレバーに proOmpA を結合させるために、proOmpA の C 末端側にシステイン変異を導入し、ビオチン標識する。

(2) SecYEG-SecA 複合体を再構成したナノディスクの調製

ナノディスクの膜蛋白質の再構成は、脂質・精製した膜蛋白質・膜骨格蛋白質を適切な比率で混合した後に、精製した膜蛋白質と脂質を可溶化させている界面活性剤を SM2 ビーズで取り除くことで行う。界面活性剤の除去と同時に、膜蛋白質が取り込まれたナノディスクが形成される。この手順で調製したサンプル中には、ナノディスクとして再構成されなかった粒子もある程度含まれるので、これらをサイズ排除クロマトグラフィーによって除去する。

(3) カンチレバーの proOmpA の修飾

カンチレバーに基質蛋白質である proOmpA を結合させるために、カンチレバーをビオチン結合 BSA とインキュベートする。ビオチン結合 BSA が吸着したカンチレバーをストレプトアビジンとインキュベートした後に、ビオチン標識した proOmpA とインキュベートして、カンチレバーを proOmpA で修飾する。

(4) ナノディスクに再構成した SecYEG-SecA 複合体の膜透過の力の測定

高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）観察の測定基板として、マイカ基板上にストレプトアビジン二次元結晶を展開したものを用いる。ナノディスクに再構成した SecYEG-SecA 複合体はビオチン標識されており、ストレプトアビジンを介して SecA ATPase が上部に位置する向きで固定できる。また、標識したビオチンによってナノディスクと測定基板との間に空間ができるため、膜を越えた基質蛋白質（proOmpA）を物理的に阻害することなく反応が達成できる。proOmpA が結合したカンチレバーを用いて、高速 AFM 観察と同時にフォースカーブ測定を行う。カンチレバーに結合した基質蛋白質が SecYEG-SecA 複合体と相互作用もしくは膜透過されることでカンチレバーに張力が加わり、カンチレバーがたわむ。このたわみをフォトダイオードで検出し、探針・試料間距離とカンチレバーに働く力（たわみ量）との関係をプロットすることでフォースカーブを得る。また、高速 AFM 観察から得られた SecA ATPase の構造とフォースカーブから得られた力学的特性から膜透過を駆動する構造を特定する。

4. 研究成果

ビオチン標識した SecY を含む SecYEG-SecA 複合体をナノディスク (ND) に再構成して安定な 1 ユニット (SecYAEG-ND) を調製した。SecYAEG-ND を測定基板として用いたストレプトアビジ

ン二次元結晶上にビオチンを介して固定し、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）で観察した。高速 AFM 観察の結果は、SecYAEG-ND が均一な粒子であることを示した（図 1 上）。また、SecYEG 複合体のみを再構成したナノディスク（SecYEG-ND）の観察結果と比較したところ、ナノディスクの膜表面が測定基板に対して水平となり、SecA ATPase が上部に位置する向きで SecYAEG-ND が固定されていることが明らかとなった。固定された SecYAEG-ND を拡大して詳細に観察したところ、SecA ATPase が複数の構造状態で存在することが示唆された。

測定基板としてストレプトアビジン二次元結晶を用いることで、SecYAEG-ND を SecA ATPase が上部に位置する向きで固定できたが、ストレプトアビジン二次元結晶の調製が煩雑であることなどの問題があったので改めて測定基板を検討した。検討の過程で、測定基板としてマイカ基板を用いた

ときに、SecYAEG-ND のナノディスクの膜表面が測定基板に対して垂直となり、SecYAEG-ND が横たわった状態で固定できることを発見した（図 1 下）。これは、ビオチン標識した膜蛋白質を含むナノディスクの固定方向が測定基板を変えることで調整できることを示し、膜蛋白質を異なる方向から高速 AFM 観察できる可能性を示唆した。そこで、他の膜蛋白質でも SecYAEG-ND と同様に測定基板への固定方向を調整できるか確かめるために、マグネシウムイオントランスポーターである MgtE をビオチン標識し、ナノディスクに再構成した。MgtE を再構成したナノディスク（MgtE-ND）をストレプトアビジン二次元結晶とマイカ基板で高速 AFM 観察したところ、ストレプトアビジン二次元結晶上では、MgtE-ND のナノディスクの膜表面が測定基板に対して水平となり、MgtE の可溶性ドメインが上部に位置する向きで固定されることを確認できた（図 2 上）。一方で、マイカ基板では、MgtE-ND のナノディスクの膜表面が測定基板に対して垂直となり、MgtE-ND が横たわった状態で固定されることを確認できた（図 2 下）。さらに、Ni²⁺イオンが配位したマイカ基板を用いることで MgtE の可溶性ドメインの構造変化の可視化にも成功した。これらの結果は、高速 AFM とナノディスク技術を組み合わせることで、膜蛋白質を真上と真横の二方向から高速 AFM 観察できることを示し、これらの成果をまとめ、新たな手法として査読付き学術誌に報告した (Haruyama *et al.*, *Structure* 27, 152 2019)。この方法は、X 線結晶構造解析などによって得られた膜蛋白質の静的な構造情報に構造変化のリアルタイムでの可視化といった動的情報を補足できるので、創薬ターゲットとして重要な膜タンパク質の機能と構造の解明の基盤になると考えられる。

一方、ストレプトアビジン二次元結晶の問題点は、マイカ基板をアミノシランとビオチン-OSu で修飾し、ストレプトアビジンを結合させてグルタルアルデヒドで処理し、ストレプトアビジンを介して SecYAEG-ND を測定基板に固定させることで改善された。次に、カンチレバーに結合可能な基質蛋白質（proOmpA）の調製に取り組んだ。当初の計画では、proOmpA にシステイン残基を導入してビオチン標識を行い、ビオチン結合 BSA で修飾したカンチレバーとストレプトアビジンを介して結合させるつもりであった。しかし、測定基板にもストレプトアビジンを使用しているため、proOmpA やカンチレバーに結合したビオチンが測定基板と相互作用する恐れがあった。そこで、リジンから成るポリペプチド鎖を持つ GFP を付加した proOmpA を調製し、アミノシラン処理したカンチレバーとグルタルアルデヒドを介して架橋する系を構築することにした。リジンから成るポリペプチド鎖を持つ GFP を付加した proOmpA の大量発現系を構築し、proOmpA を unfold した紐状の状態を得るために尿素存在下で精製したところ、高純度の精製産

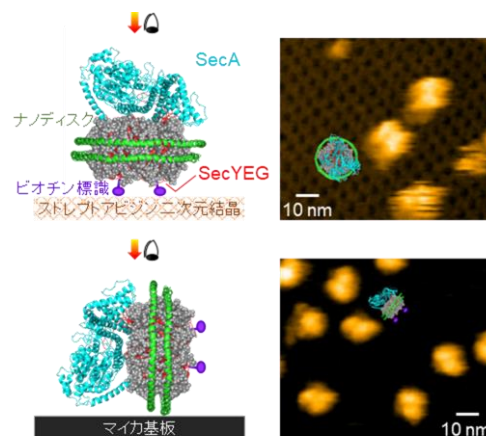


図 1 ストレプトアビジン二次元結晶（上）あるいはマイカ基板（下）に固定された SecYAEG を含むナノディスクの模式図と高速 AFM 画像

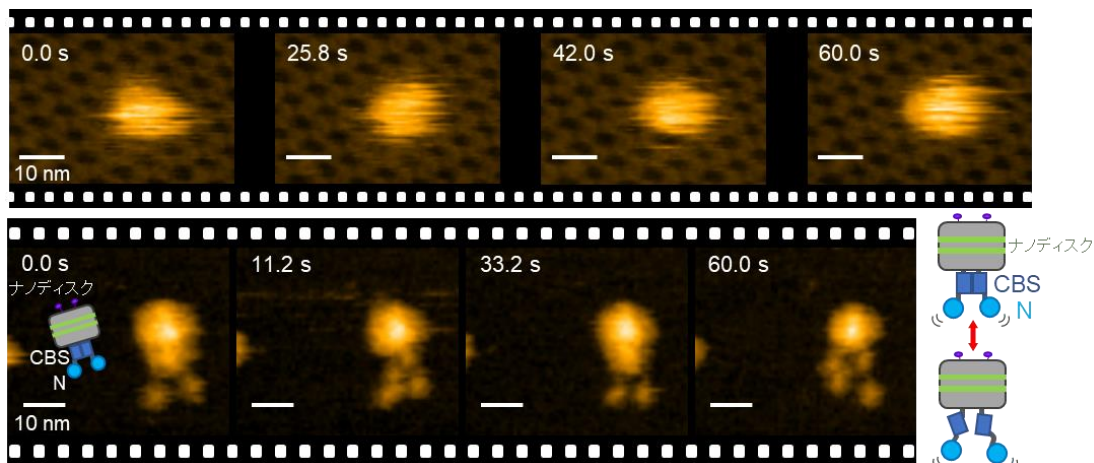


図 2 ストレプトアビジン二次元結晶（上）あるいはマイカ基板（下）に固定された MgtE を含むナノディスクの高速 AFM の連続画像

物を得ることができた。今後は、精製した proOmpA と修飾したカンチレバーを架橋したものを
用いて、蛋白質の膜透過の力を測定する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① [Haruyama T](#), Sugano Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, Konno H, Tsukazaki T, Single-unit imaging of membrane protein-embedded nanodiscs from two oriented sides by high-speed atomic force microscopy, *Structure*, 査読有, 27 巻, 2019 年, pp. 152-160
DOI: 10.1016/j.str.2018.09.005
- ② Tanaka Y, Izumioka A, Abdul HA, Fujii A, [Haruyama T](#), Furukawa A, Tsukazaki T, 2.8-Å crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 505 巻, 2018 年, pp. 141-145
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.043
- ③ [Haruyama T](#), Uchihashi T, Yamada Y, Kodera N, Ando T, Konno H, Negatively Charged Lipids Are Essential for Functional and Structural Switch of Human 2-Cys Peroxiredoxin II, *J. Mol. Biol.*, 査読有, 430 巻, 2018 年, pp. 602-610
DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.020

[学会発表] (計 4件)

- ① [Takamitsu Haruyama](#), Yasunori Sugano, Noriyuki Kodera, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki, High-speed AFM imaging of membrane protein reconstituted in nanodisc, 第 18 回 日本蛋白質科学会年会、2018 年
- ② [春山隆充](#)、菅野泰功、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、田中良樹、紺野宏記、塚崎智也、ナノディスクに再構成した膜タンパク質の高速 AFM 観察、第 15 回 21 世紀大腸菌研究会、2018 年
- ③ [Takamitsu Haruyama](#), Yasunori Sugano, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki, High-speed AFM imaging of membrane protein embedded in Nanodisc, The 6th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, 2018 年
- ④ [Takamitsu Haruyama](#), Yasunori Sugano, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki, High-speed AFM observation of membrane protein embedded in Nanodisc, 第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。