

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750073

研究課題名(和文)

ジャイアントベシクルを用いた膜タンパク質その場合成・機能解析法の開発

研究課題名(英文)

Development of cell-free synthesis and imaging of membrane proteins in giant vesicles

研究代表者

豊田 太郎 (TOYOTA TARO)

東京大学・大学院総合文化研究科・講師

研究者番号：80422377

研究成果の概要(和文)：本研究は、化学物質受容体やイオノフォアとして機能する膜タンパク質が、厚さ5 nmの生体膜において如何に構造形成し、機能するかという非平衡系のダイナミクスを計測する手法の開発を目的とした。夾雑物のないモデル生体膜として袋状脂質二分子膜であるジャイアントベシクルに着目し、mRNAから膜タンパク質が合成される反応系の内封法を構築した。蛍光膜タンパク質の一つであるeGFP-BmOR1をGV内部で合成したところ、これが自発的に膜に組み込まれることを明らかにした。一方、厚み方向でナノメートルの分解能をもつ反射干渉顕微鏡を構築した。これにより、基板上に接着したジャイアントベシクル膜の非平衡状態における特異な変形を観測することができた。以上の成果は、生体模倣反応場であるジャイアントベシクルを用いて、膜タンパク質の形成過程や機能発現に分析化学的にアプローチできる要素技術として重要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the development of an analytical method to observe the non-equilibrium dynamics of membrane proteins incorporated into model cell membrane. Giant vesicle (GV), which is closed bilayer lipid membrane with cellular size, was used as a reactor of model cell membrane for the cell-free synthesis of a fluorescent membrane protein, eGFP-BmOR1, and the spontaneous membrane insertion of eGFP-BmOR1 synthesized inside of GV was successfully observed. Upon the construction of a reflective interference contrast microscope, the non-equilibrium dynamics of GV settling on a glass substrate was revealed in a nanometer thickness resolution. The combination of these two technologies is expected to promote further progress in the analysis of the non-equilibrium dynamics of membrane proteins and lipid membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：コロイド・界面化学，分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析，膜タンパク質，ベシクル，反射干渉顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

化学物質受容体やイオノフォアとしてはたらく膜タンパク質は、生体膜上で組み込まれている脂質二分子膜と協同して機能を発現している。つまり、遺伝子をもとにアミノ酸が重合したポリペプチドが、脂質二分子膜

の裏膜と分子間相互作用しつつ折り畳まれ、表膜まで貫通して、自己組織化により構造形成したり多量体となる。この構造自体が膜タンパク質の本質であり、膜タンパク質を支持している脂質二分子膜の構造や流動性が重要であることが最近の研究でわかってい

る。例えば、レーザー分光や電気化学的計測法を活用することで、平坦な人工の脂質二分子膜（黒膜と呼ばれる）を反応場として、単一イオノフォアのイオン透過率を計測し、イオン透過率の脂質依存性が明らかになっている。しかし、これらの先行研究では、生体から抽出した出来合いの膜タンパク質を黒膜に埋め込む手法を基盤技術としているため、膜タンパク質がポリペプチドとして合成され、脂質二分子膜との相互作用（裏膜→表膜の順）を通じて自己組織化してはじめて機能するというダイナミクスの解明へ迫ることができないという問題がある。そこで本研究は、脂質二分子膜から構成され、大きさが細胞サイズであるジャイアントベシクル（GV とよぶ）において、その内部で膜タンパク質を合成し、膜へ自己組織化する反応場の形成を着想した（図 1 a）。最も一般的な GV 形成方法である薄膜膨潤法では、多重膜の GV が数多く形成され、反応場としての均質性は良好でない。そこで、油中水滴型（water in oil, W/O）エマルジョンと遠心沈降を利用する GV 形成方法（以下遠心沈降法と呼ぶ）を利用することにした。遠心沈降法の最大の特徴は、脂質二分子膜を形成するのに自己集合を利用するのではなく、W/O エマルジョンとして形成した単分子膜を裏膜、油-水界面に形成した単分子膜を表膜として張り合わせて二分子膜とする点である。そのため、膜が多重化することなく、形成される GV の多くが均質な一枚膜になると期待される。

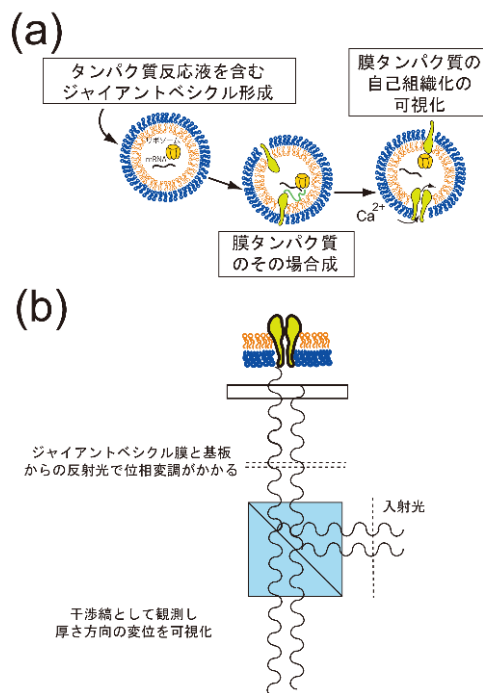


図 1 研究構想の全体図

また、従来、膜タンパク質一分子の可視化は、蛍光分子やナノ粒子で標識し、全内部反射蛍光顕微鏡や共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いた計測手法で行われている。しかしこれらの手法では、脂質二分子膜の運動と膜タンパク質を同時に計測する際に、厚さ方向の空間分解能が十分でない。そこで本研究は、膜からの反射光と基板からの反射光との光干渉を活用した干渉像を観測することで、厚さ方向でナノメートルの分解能が実現される反射干渉顕微鏡に注目した（図 1 b）。

2. 研究の目的

本研究の目的を、GV という生体模倣反応場と反射干渉顕微鏡という高分解能イメージング装置により、脂質二分子膜と膜タンパク質の自己組織化を可視化する方法論の開発とした。この目標に対して、達成すべきポイントを以下のように設定した。

- (1) 蛍光膜タンパク質 eGFP-BmOR1 の GV 内合成と可視化
- (2) 反射干渉顕微鏡の構築と非平衡 GV 膜ダイナミクスの観測

3. 研究の方法

(1) 蛍光膜タンパク質 eGFP-BmOR1 の GV 内合成と可視化

本研究では、遠心沈降法のエマルジョン粒子の最終沈降速度に焦点をあて、エマルジョン粒子に比重をつけるようタンパク質の無細胞翻訳反応液に糖を混合して GV 形成の条件検討を行った。

まず、BmOR1 の蛍光標識タンパク質である eGFP-BmOR1 の mRNA 溶液、および無細胞翻訳反応液 Transdirect™ Insect Cell, スクロースを溶解したトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を内相反応液とした。リン脂質とポリエチレングリコール鎖修飾型リン脂質、コレステロールを溶解した流動パラフィン/スクアレンの混合油層に内相反応液を加え W/O エマルジョンを調製し、これを、グルコースと塩化ナトリウムを含むトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) の上に重層し、遠心分離することで GV を作製した（図 2）。この GV 分散液を、25°C で 4 時間静置し、その後、微分干渉/蛍光顕微鏡および共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観測した。

(2) 反射干渉顕微鏡の構築と非平衡 GV 膜ダイナミクスの観測

反射干渉顕微鏡の光源として、GV と基板以外の光の干渉を抑えるため、非コヒーレント光である水銀ランプに 520 - 550nm のバンドパスフィルターを通じたものを用いた。この光を偏光子で直線偏光とした後、 $\lambda/4$ 波長板内臓の対物レンズを通してガラス基板上の GV に照射した。GV 膜からの反射光と

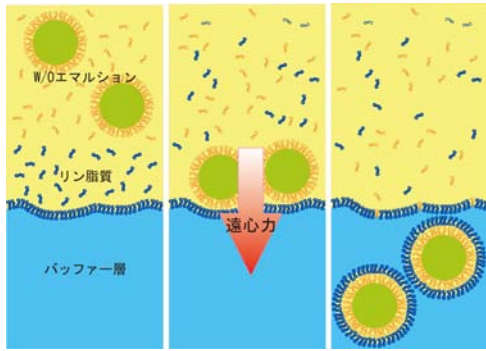


図2 遠心沈降法の模式図

ガラス基板からの反射光をもう一つの偏光子を通じた後、干渉縞をモノクロ CCD カメラで撮影した。ガラス基板はあらかじめ、ピラニア洗浄の後に紫外光-オゾン洗浄とすることで、汚染分を除去した。干渉縞の解析には、Image J ソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

(1) 蛍光膜タンパク質 eGFP-BmOR1 の GV 内合成と可視化

①主な成果

遠心沈降法で形成された GV は球形で膜多重度は小さかった。また、GV 膜に特に強い蛍光が観察された GV の個数は全体の 50% であった (図 3)。一方、eGFP-BmOR1 をあらかじめ試験管内で無細胞翻訳反応液を用いて合成し、これを遠心沈降法で GV に内包すると、膜のみ特に強い蛍光が観察される GV はなく、GV 内部全体に蛍光が観察された GV が 100% であった。以上の結果より、膜に蛍光が観察された GV は、GV 内で eGFP-BmOR1 が合成され膜へ自発的に移行したものと考えられる。

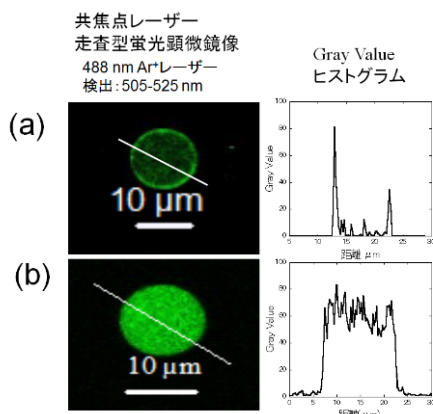


図3 eGFP-BmOR1 が組み込まれた GV の共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡像。(a) 内部で eGFP-BmOR1 が合成された GV, (b) 試験管で合成された eGFP-BmOR1 を内包した GV 内包。

②国内外におけるインパクトと今後の展望

本研究で用いた無細胞翻訳反応液は、昆虫細胞由来であり、カイコガ由来である受容体タンパク BmOR1 の蛍光標識化タンパク eGFP-BmOR1 のみならず、他の受容体タンパクも本技術により GV 内で合成することが可能である。特に、この反応液は反応温度が 25°C で至適である点は、GV の安定性とも相性が良いといえる。これは、ジャイアントベシクルが機能性膜タンパク質の形成過程や機能発現を観測できる反応場としての応用を示すものとして興味深い。

(2) 反射干渉顕微鏡の構築と非平衡 GV 膜ダイナミクスの観測

①主な成果

反射干渉顕微鏡から得られる干渉縞を用いて、電解質溶液中のポリスチレンビーズ (半径 20 μm) の基板からの高さを見積もったところ、 11 ± 2 nm となり、DLVO 理論により求められる理論値と同等であった。したがって、本研究で構築した反射干渉顕微鏡が高さ方向でナノメートルの分解能をもつことが示された。

次に、内外で比重に差がついた直径数 μm の GV を遠心沈降法で作製し、これをガラス基板上にのせたところ、GV は変形して面状に基板と接着してゆき、その後、破裂するという非平衡ダイナミクスを観測した。特に、内外の比重の比が 1.3 程度となると、破裂の直前の 1~3 秒程度だけ、上げ底のように膜中央部が基板から数十 nm 浮き上がる現象を見出した (図 4)。これは、GV が基板と面状に接着することで、GV 膜の端にひずみエネルギーがたまり、それを解消するように全体を赤血球型に変形して GV が安定化するものと考えられる。

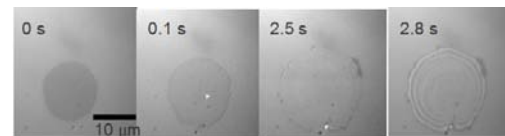


図4 ガラス基板上で形態変化する GV の反射干渉顕微鏡像。

②国内外におけるインパクトと今後の展望

GV 膜のガラス基板上数 nm での非平衡ダイナミクスを観測できたことは、GV 膜の界面選択的イメージング技術として重要である。現状では、膜タンパク質が組み込まれた GV の外相液の屈折率に入射光の波長があっていないため、膜タンパク質が組み込まれた GV 膜の界面近傍でのダイナミクス観測にまで至っていない。これらが達成されれば、いまだ観測されなかった膜タンパク質の脂質

二分子膜での自己組織化のダイナミクスに迫ることのできる新しい手法としてその意義は大きい。また本研究成果は、疑似細胞膜としてのGVの有効性を示すことができ、新たな分析化学的展開を期待できる。

最後に、蛍光膜タンパク質 eGFP-BmOR1 の mRNA を提供して下さった東京大学先端科学技術研究センターの神崎亮平教授、櫻井健志博士、田淵理史氏に謝意を表します。

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 1 件)

- ① K. Nishimura, T. Hosoi, T. Sunami, T. Toyota, M. Fujinami, K. Oguma, T. Matsuura, H. Suzuki, T. Yomo, “Population Analysis of Structural Properties of Giant Liposomes by Flow Cytometry”, *Langmuir*, **25**, 10439–10443 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① 豊田太郎, 外部刺激によるハイブリッド・ジャイアントベシクルの形態変化, 2011 年春季第 58 回応用物理学関係連合講演会, 神奈川工科大, 2011. 3. 25. [予稿のみ]
- ② 豊田太郎, 遠心沈降によるリポソーム形成技術と応用, 分子ロボティクス研究会, 東工大田町キャンパスプラザ, 2010. 7. 30.
- ③ 豊田太郎, 遠心沈降法によるジャイアントベシクルの作製とバイオ分析への応用, 日本分析化学会第 58 年会, 札幌(北海道大学), 2009. 9. 25.

[図書] (計 1 件)

- ① 藤浪真紀, 岡田哲男, 加納健司, 久本秀明, 豊田太郎, 基礎から理解する化学 3 分析化学, みみずく舎・医学評論社 (2009 年 10 月).

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等

http://www.dbs.c.u-tokyo.ac.jp/labod2/toyota_taro.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田太郎 (TOYOTA TARO)

東京大学・大学院総合文化研究科・講師

研究者番号: 80422377