

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22550170

 研究課題名（和文） 有害重金属輸送膜タンパク質のセンサ素子としての利用に関する
基盤的研究

 研究課題名（英文） Basic research on handling of heavy-metal ion transporter
protein as a sensor element

研究代表者

馬場 照彦 (BABA TERUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：40357794

研究成果の概要（和文）：水銀などの有害重金属輸送に関与する膜タンパク質を重金属センサ素子として利用するため、これら膜タンパク質の大量発現法を確立するとともに、膜タンパク質を複合化する膜基材として、重金属イオンの非特異的結合性・透過性が低く、機械的に安定な人工脂質群を開発した。また膜タンパク質・人工脂質膜複合体を基板に固定化するにあたって、膜タンパク質の配向性を制御するため、人工脂質と脂質結合性タンパク質によるナノ開放構造調製法を開発した。

研究成果の概要（英文）：In order to utilize membrane proteins involved in heavy-metal ion transport, such as mercury, as a heavy-metal sensor element: (1) a large-scale production method of the membrane proteins; (2) mechanically stable artificial lipid membrane matrices of which binding affinity and permeability to heavy-metal ion are low; (3) a preparation method of nanometer-scale open structure of artificial lipids and lipid-binding proteins for immobilization onto the substrates, have been developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、機能材料・デバイス

キーワード：生体機能応用デバイス

1. 研究開始当初の背景

水銀などの重金属類は産業上重要である一方、生体への作用も強いいため、環境中への拡散は極力防止されるべきものであり、また、これらの環境中におけるモニタリング技術として簡便・高感度な手法が求められている。

近年、水銀など重金属への耐性を獲得した微生物による重金属処理法が環境修復技術

の一つとして注目されるようになった。これらの微生物は、菌体内反応によって重金属類の無毒化を達成しているが、重金属耐性機構については、現在までに分子生物学的手法などにより明らかにされつつあり、水銀耐性の場合、関与するオペロンとその産物である各種タンパク質が同定されている。すなわち、このオペロンの発現により、 Hg^{2+} を菌体内に

輸送するタンパク質や、輸送された Hg^{2+} を菌体内で揮発性 $Hg(0)$ に還元するタンパク質が産生され、菌体外に $Hg(0)$ を排出することで無毒化が図られている。これらのタンパク質群 (Mer タンパク質群) を産生するオペロンが菌体内プラスミドに由来することも示されている。これまで同定されている Mer タンパク質群のうち、特に形質膜に存在して特異的に重金属を輸送する膜貫通型タンパク質は、少なくとも 4 種の異なる遺伝子が同定され、3 回膜貫通型 MerT などが知られている (図 1)。しかし、生体膜のイオン輸送機構は多くの研究がなされているものの、この膜タンパク質の膜内での存在状況や水銀の輸送機構については不明である。

このように Mer 膜タンパク質群の重金属イオン輸送機構は現在まで未解明であるが、特定の重金属イオンを認識して輸送することから、これらの膜タンパク質群を生体外で安定に利用できれば、水銀などの重金属イオンを検出するセンサが構築可能と期待される。

研究代表者は、通常の脂質膜に比べて膜透過性の低い古細菌モデル脂質膜を開発し、そのプロトン低透過性と高い機械的安定性、光合成膜タンパク質の再構成と安定なタンパク質機能の発現を示すとともに、より安定な古細菌モデル脂質膜の可能性を示している。以上を背景に、Mer タンパク質群と人工脂質膜基材とを複合化する技術を確認するため、それらに必要な要素技術の開発を進めた。

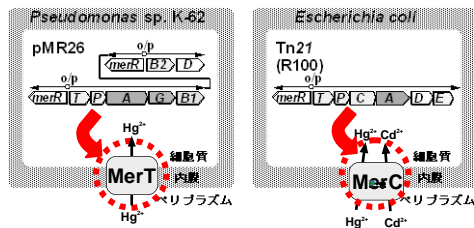


図 1 菌体内での水銀耐性オペロンの構造と水銀輸送膜タンパク質 (MerT, MerC) の発現

2. 研究の目的

本研究では、重金属輸送膜タンパク質の機能とその利用に注目する。重金属輸送本体である Mer 膜タンパク質群が大量に取得可能で、かつ生体外で安定に利用できれば、その機能の検証や重金属イオンを検出するセンサ構築への応用が可能と期待される。このため、(1) 膜タンパク質の大量発現法を確立するとともに、(2) 膜タンパク質を複合化する膜基材として、重金属イオンの非特異的結合性・透過性が低く、機械的に安定な人工脂質群を提案する。また、(3) 膜タンパク質・人工脂質膜複合体を基板に固定化する場合、イオン輸送方向の制御が重要であるため、膜タンパク質の配向性を制御するツールとして、人工脂質と脂質結合性タンパク質によるナノ開

放構造の調製法開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 重金属輸送膜タンパク質の大量発現

重金属輸送膜タンパク質をコードした遺伝子を組み込んだプラスミド (連携研究者 (清野) 作製) を用い、遺伝子組換え技術により大腸菌ほかカイコにおいて大量発現が可能かどうかを検証した。特に膜タンパク質の精製上必要であるばかりでなく、基板上での固定基として利用可能な His-tag をタンパク質分子内に導入した。

(2) 人工脂質膜基材の開発

機械的に安定で、目的の金属イオンの結合性や透過性が小さい人工脂質膜を、古細菌由来脂質やフッ素系脂質を参考に、連携研究者 (高木) の協力により合成、膜安定性やイオン結合性・透過性を界面測定、蛍光測定などにより評価した。さらに膜タンパク質・人工脂質膜を電極などの基板に固定化するため、アンカー脂質による膜透過性を電気化学測定により評価した。

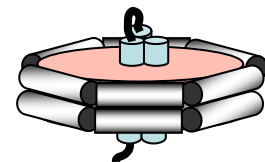
(3) 人工脂質ナノ開放膜構造の開発

通常の膜タンパク質・脂質再構成膜としては、閉鎖小胞であるベシクル膜であるが、膜タンパク質の膜内での配向がランダムになるため、脂質ナノ開放構造である脂質ディスク (図 2) の調製を検討した。このため、連携研究者 (斎藤) の協力により、脂質結合性タンパク質から成る人工脂質ナノ開放膜構造の生成法について検討し、生成状況を電顕や分光学的手法などにより評価した。

図 2 脂質ディスク構造の

模式図

(中央の脂質膜を脂質親和性タンパク質が取り巻く。中心に膜タンパク質が配置)



4. 研究成果

(1) 重金属輸送膜タンパク質の大量発現

精製および基板固定化に有用な His-tag を C 末に導入した膜タンパク質を発現するプラスミドを用い、最も小さい分子量で 2 回膜貫通型 MerF について大量発現の可否を検証した。カイコを利用しての産生により、MerF が発現可能であることを確認するとともに、ハンドリング可能な程度に大量発現できることを認めた。

(2) 人工脂質膜基材の開発

例えば古細菌由来脂質を参考にして合成した安定な人工脂質膜として、図 3 に示す人工脂質 (PTEPC) を得ている。偏光顕微鏡で

水中において柔らかな積層膜構造を形成し、電顕観察でベシクル膜を形成しており、一般に膜流動性が必要とされる膜タンパク質の再構成膜基材としては有用と考えられる。またこの脂質では、通常二分子膜形成脂質とは異なり、単分子膜で通常の膜構造と同じになるので、膜側方からのズリ応力に対して強度が高いと期待される。さらにこの脂質膜は、通常二分子膜形成脂質に比べて、重金属イオン Hg^{2+} の膜結合性・透過性が低いことが、例えば蛍光プローブ測定により認められ、重金属輸送膜タンパク質の再構成膜系として望ましいものであることがわかった。

他方、膜タンパク質・人工脂質膜複合体を安定に電極などの基板に固定化するため、脂質膜に導入するアンカー脂質を調製し、その自己組織化膜を金電極基板に作製して、膜バリア性を評価した(図4)。アンカー脂質分子内の親水性残基としては、イオンが電極表面に近づけるよう、水和性の高いポリオキシエチレン鎖を用いた。親水基が長くなると、例えば Br⁻ による金溶解を指標とした膜安定性は低下したが、この親水鎖がある程度長くてもバリア性(印加電圧に対する電流抑制)は比較的維持されることがわかり、これと膜タンパク質・単分子膜形成脂質膜とを複合化させることで、非特異的透過性の低い膜系を電極などの基板上に固定化可能と期待される。

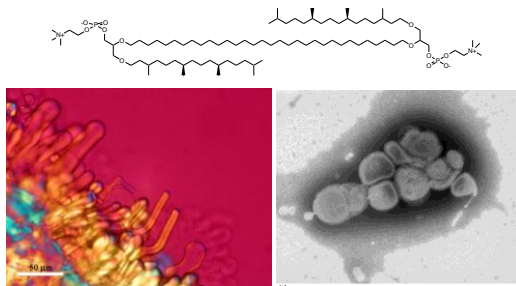


図3 古細菌由来脂質を参考とした人工脂質膜基材(上) 水中での積層膜構造(下左)およびベシクル膜構造生成(下右)

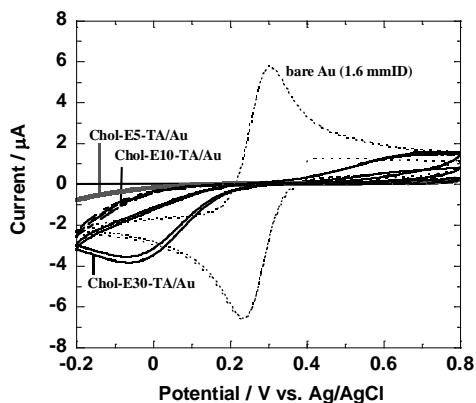


図4 金電極基板上に形成したアンカー型自己組織化

(3) 人工脂質ナノ開放膜構造の開発

脂質ディスク形成を検討するため、ここでは血しょう HDL に由来するアポリポタンパク A-I (apoA-I) と人工脂質との複合体形成を検討した。その結果、脂質と apoA-I との混合比率により生成する複合体構造は変化(ディスクでなくベシクル膜生成など)するものの、最適化比率においては、apoA-I は脂質の分子構造にあまり依らず、人工脂質 PTEPC やフッ素系脂質でも直径約 10 nm の開放膜構造が自発的に生成することがわかった(図5)。またこの開放膜構造を支える apoA-I は、例えば二次構造(α-ヘリックス含量)から観察すると、通常二分子膜脂質に対して、フッ素系脂質、人工脂質 PTEPC いずれにおいても、ほぼ同じであった(図6)。さらに脂質ディスク内の微視的な環境も、通常ベシクル膜とほぼ同様であることが蛍光プローブ法により推測され、膜タンパク質を収容してハンドリングするツールとしてベシクル膜同様であると考えられる。

上述で得られた各要素の知見・成果をもとに、これらを複合化することによって、重金属輸送膜タンパク質の基本的な機能評価、ならびにそのセンサ素子としての利用可能性の検証を今後さらに進めていく予定である。

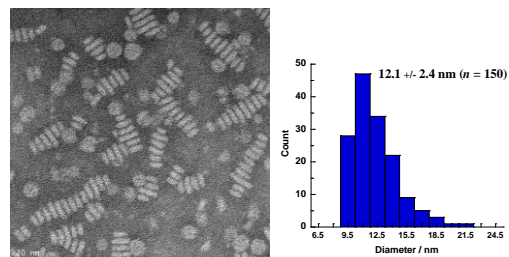


図5 人工脂質 PTEPC と apoA-I との複合化による開放膜構造(脂質ディスク)の生成
(左)電顕写真(スケール: 20 nm)
(右)脂質ディスクの直径分布

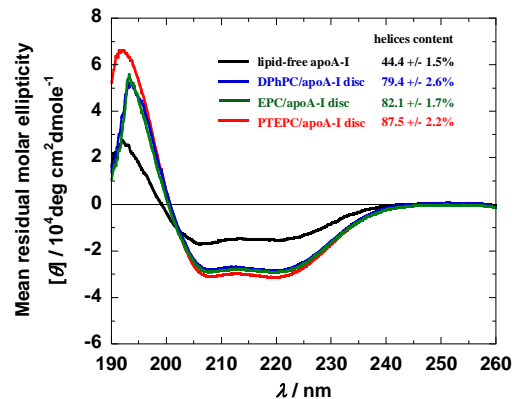


図6 種々の脂質と apoA-I から成る開放膜構造(脂質ディスク)内の apoA-I の二次構造(CD スペクトル)

評価

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)

[学会発表] (計9件)

- ①馬場照彦, 他、テトラエーテル型人工リン脂質とアポリポタンパク質からの膜ディスク形成、第50回日本生物物理学会年会、平成24年9月24日、名大東山キャンパス(愛知県)
- ②馬場照彦, 他、部分フッ素化リン脂質と脂質親和性タンパク質からの膜ディスク形成、日本膜学会第34年会、平成24年5月9日、早大西早稲田キャンパス(東京都)
- ③馬場照彦, 他、分枝鎖人工リン脂質とアポリポタンパク質 A-I からの膜ディスク形成、日本化学会第92春季年会、平成24年3月27日、慶大日吉キャンパス(神奈川県)
- ④馬場照彦, 他、安定膜形成性人工リン脂質と脂質親和性タンパク質との複合体形成、第5回バイオ関連化学シンポジウム、平成23年9月12日、つくば国際会議場(茨城県)
- ⑤馬場照彦, 他、安定な tethered 脂質膜修飾電極の調製と膜特性評価、第10回産総研・産技連推進会議ライフサイエンス-バイオテクノロジー合同研究発表会、平成23年2月1日、産総研つくばセンター(茨城県)
- ⑥馬場照彦, 他、薄膜型バイオセンサ構築のための tethered 脂質膜修飾電極の調製と膜特性評価、日本膜学会第32年会、平成22年5月13日、産総研臨海副都心センター(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 照彦 (BABA TERUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：40357794

(2) 連携研究者

高木 俊之 (TAKAGI TOSHIYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：10248065

清野 正子 (KIYONO MASAKO)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：30239842

斎藤 博幸 (SAITO HIROYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60300919