

氏 名 尾上 靖宏

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大 1274 号

学位授与の日付 平成 21 年 9 月 30 日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Single-molecule observation of conformational changes  
in membrane proteins reconstituted in a giant liposome

論文審査委員 主 査 教授 加藤 晃一  
教授 桑島 邦博  
教授 青野 重利  
教授 神山 勉（名古屋大学）  
教授 木下 一彦（早稲田大学）  
教授 平田 文男

## 論文内容の要旨

膜蛋白質は膜に存在する蛋白質で生理的に非常に重要な役割を担っている。どんな生物でも、遺伝子のうち20–30%が膜蛋白質をコードしていることが知られ、細胞の中では信号伝達、イオン濃度勾配の維持、エネルギー変換などの様々な生命活動の基盤となっている。ところが、膜蛋白質は両親媒性のため取り扱いが難しく、可溶性蛋白質ほど研究が進んでいない。

これら膜蛋白質の機能を詳しく理解するためには、当然のことながら、静的な構造情報だけでなく動的な情報も必要とされる。膜蛋白質の機能に関して特にダイナミクスに着目すると、細胞中での局在や拡散の様子など蛋白質の位置に関するものや、2種類の蛋白質の結合・解離など相互作用に関するものを扱った研究はたくさんある。しかしながらそれらの研究に比べ、1つの膜蛋白質で起こる構造変化のダイナミクスをリアルタイムで測定した例は極端に少ない。膜蛋白質の構造解析が進んでいないのも一因であるが、革新的な構造変化検出法の開発が期待されていることは言うまでもない。

一方で、近年、蛋白質分子を一分子レベルで観察・操作する技術が飛躍的に進歩している。RNAポリメラーゼがDNAを1塩基ずつ転写する様子や、リボソームがRNAを1コドンずつ翻訳する様子が観察されたのは良い例である。多分子の挙動を平均化してしまう生化学的手法では知ることができなかった蛋白質分子の確率的振舞いを一分子レベルの実験により測定することができる。蛋白質の構造変化についても一分子レベルで観察・操作するアプローチは決定的な成果を挙げている。特に、大きなプローブを使った回転運動の一分子観察法は、蛋白質の微小な構造変化をプローブが大きな動きに拡大してくれるため、構造変化の様子を視覚的にわかりやすくしてくれる利点がある。この方法は今までに $F_1$ -ATPaseやべん毛モーターなどの回転モーターの回転機構の解明に多大な貢献してきた。

このような背景を踏まえ、今回彼はこの博士論文で脂質膜に埋もれた膜蛋白質の構造変化を一分子レベルで観察する新しい方法論を報告する。まず始めに脱水和・再水和法により膜蛋白質を直径10~100マイクロメートルの袋状の巨大膜小胞に再構成させる。巨大膜を用いる特長は膜小胞内外の溶液組成をそれぞれ独立に制御可能とする点にある。次に巨大膜中に埋もれた蛋白質分子をガラス表面に固定させる。さらに膜小胞内からプローブを結合させ、その動きから構造変化の検出をする。巨大膜小胞内の大きな空間はプラスチックビーズやアクチン線維のようなマイクロメートルスケールのプローブの動きを邪魔しない。例としてATP存在下にて巨大膜中に埋もれた $F_0F_1$ -ATP合成酵素に結合させたプラスチックビーズの回転運動の観察に成功した。彼の知る限り、大きなプローブを使って膜に再構成した膜蛋白質の構造変化を観察した初めての例である。ここで開発した技術は他の膜蛋白質の機能やダイナミクスを一分子レベルで研究するのに役立つであろう。

この博士論文は4つの章からなる。第1章では研究の背景について概観する。膜蛋白質とは何か、一分子測定で何がわかるか、蛋白質の構造変化の重要性、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素とは何かということに触れる。最後に博士論文の目的を述べる。

第2章ではこの博士論文で用いた実験材料や方法について説明する。まず始めに特別な薬品の入手先、用いた溶液の組成について記す。次に、 $F_0F_1$ や巨大膜などの試料の調製法について詳説する。カバーガラスやプラスチックビーズの調製法についても述べる。続いて、顕微鏡を使って、巨大膜の中や界面活性剤中の $F_0F_1$ の回転運動を観察する方法、巨大膜小胞内に蛍光色素をインジェ

クトする方法について記述する。最後に顕微鏡イメージングシステムとデータ解析法について詳述する。

第3章では実験結果について報告する。巨大膜への $F_0F_1$ の再構成は、透析法により調製した $F_0F_1$ 微小膜を脱水和・再水和法により巨大化することで達成した。この $F_0F_1$ を含む巨大膜をNi-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) でコートしたカバーガラス上に移し、沈降させることでガラス表面へ固定させた。イミダゾール存在下では巨大膜が固定されなかったことから、確かに $F_0F_1$ のヒスチジンタグを介して巨大膜がガラス表面へ特異的に固定されていることがわかった。続けて、ガラス表面へ固定した巨大膜中に埋もれた蛋白質へプローブ (ストレプトアビジンビーズ) を結合させるため、ガラスキャピラリーを用いてビーズを巨大膜小胞内へインジェクトした。ビオチンラベルした $F_0F_1$ ではビーズがガラス表面で固定されたのに対し、ラベルしていない $F_0F_1$ ではガラス表面にビーズが付かなかった。このことからストレプトアビジンビーズは確かに巨大膜中に埋もれたビオチンラベルした $F_0F_1$ へ特異的に結合していることがわかった。その上、この巨大膜中に埋もれた $F_0F_1$ へ結合したビーズはATP存在下で回転運動を示した。すなわち膜中に埋もれた $F_0F_1$ のATP加水分解に駆動された回転運動 (構造変化) の観察に成功した。回転方向は反時計回りで予想された通りだったが、回転スピードにはばらつきがあった。これは今回使用したプラスチックビーズの大きさや形が不均一であったため、それに働く粘性抵抗の違いで説明できる。プラスチックビーズの詳細な形が顕微鏡ではわからなかったため、回転運動の解析はこれ以上できない。他には $F_0F_1$ に効く阻害剤が回転運動に及ぼす影響を論じる。さらに巨大膜の実験系で、回転する $F_0F_1$ が確実に膜に埋もれているであろう2つの証拠 ( $F_0F_1$ が水中では回転しないことと回転していたビーズが2次元拡散することがある) を提示する。そして最後に巨大膜小胞内に封入した蛍光色素の強度変化から、膜が無傷で特に大きな穴が開いていないことを示す。

第4章では、この博士論文で開発した新しい実験系の長所や展望を述べる。巨大膜を使った方法は、サンプルチャンバーにたくさんの巨大膜があると利点がある。一度サンプルを用意すれば、実験途中で膜を壊してしまっても、すぐに新しい巨大膜を使って実験を再開できる。大きなプローブを使う方法の長所はデータの解釈が容易ということと、サンプルへ与えるダメージが少ないことである。今後の課題として巨大膜の膜電位やイオン濃度勾配を制御する点を挙げる。もしこれらを制御することができれば、今回開発した構造変化を観察する方法と組み合わせることにより $F_0F_1$ がATP合成している時の回転観察や他の膜蛋白質の構造変化観察などに応用できる。

## 博士論文の審査結果の要旨

細胞膜や細胞内器官の膜など、生体膜中で機能する膜たんぱく質は、輸送・信号伝達など生理的に重要な機能を担っている。しかし、構造・機能とも膜環境に依存しているため、水溶性たんぱく質に比べて研究が遅れている。近年、一分子観察によりたんぱく質の構造変化と機能の関係を明らかにする研究が盛んになってきたが、膜たんぱく質一分子の構造変化の観察例はほとんどない。とくに、光学顕微鏡でも見えるような、(たんぱく質分子に比べて遙かに)大きなプローブを付けてやると、どのような構造変化が起きるのが一目で分かるのだが、この手法に限ると、膜たんぱく質への応用はまだ一例もない。

これを可能にしたのが、本研究である。膜たんぱく質をガラス面上に固定し、ミクロンサイズのプローブを付けて、構造変化に伴うプローブの動きを捉える手法を開発した。膜たんぱく質が袋状の脂質膜に埋め込まれて(再構成されて)いるのがみそで、内外の溶液、すなわち膜たんぱく質の機能にとって重要な膜の両側の溶液組成を、それぞれ自在に制御できる。通常脂質膜小胞よりずっと大きな、100ミクロンオーダーの巨大膜胞(giant liposome)を作ることにより、内側へのプローブや溶液の注入を容易にした。応用例として回転分子モーターであるATP合成酵素を取り上げ、そのATP駆動の回転(構造変化)を、ミクロンサイズのプラスチックビーズの動きを通じて一分子観察することに成功した。

第1章は序論で、上記の背景を概観した後、なぜ巨大膜法を採用したのかが述べられている。

第2章は材料・方法で、ATP合成酵素の精製・化学修飾から巨大膜への再構成、ガラス面への固定、ビーズの注入、回転観察、など全ての手法が、再現可能なように詳述されている。

第3章が実験結果である。2章に述べた手順に従い、各段階で計画したとおりの結果が得られたことが確認された。ATP合成酵素の全てのサブユニットが揃っていること、ビーズおよび蛍光色素を結合させるための酵素の化学修飾がうまくいっていること、はゲル電気泳動で示した。巨大膜への組み込みは、蛍光ラベルした酵素の顕微鏡観察で確認した。酵素を特異的に吸着するよう処理したガラス面上に再構成巨大膜胞を沈降させると、吸着力により袋状膜がひしゃげ、ガラス面に広々と接地することが分かった。この安定な吸着のおかげで、ガラス微小針によるビーズの注入は容易となった。注入されたビーズは、合成酵素に特異的に結合することが示され、さらにATP存在下での回転が観察された。回転している分子はきちんと膜内にあり(膜構造が壊れたりしておらず)、また袋状膜全体としても欠陥が無く内部に注入された蛍光色素を何分も保持できることが示された。まとめると、膜たんぱく質が、本来の機能の場である膜の中で(界面活性剤のミセル中などでなく)、機能に伴う構造変化をすところを、大きなプローブにより一目で分かる形で捉えることに成功した。

第4章は考察で、開発した手法の長所・展望が論じられている。最大の長所は、一度の試料調製で多数の巨大膜胞が得られることで、顕微鏡の視野を移動しながら、次々と実験・観察を繰り返せる。一方、残された最大の課題は、膜の両側の溶液組成を独立に変えて、あるいは膜に電位をかけて、機能への影響を見ることで、技術的にはすでに可能であるが、実際に特定のたんぱく質に付き機能がどのように制御されるのかを見せて欲しい。

以上一連の研究成果は、すでに英文論文として *Biochimica Biophysica Acta - Biomembrane* 誌に印刷されており、本審査委員会は、尾上 靖弘君の提出論文は学位を与えるに相応しいものとなっていると判定した。