

研究報告書

「膜タンパク質の構造変化と物質輸送の1分子同時計測技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 渡邊 力也

1. 研究のねらい

本研究では、マイクロデバイス(MEMS)を利用して、物質輸送に関わる膜タンパク質の構造変化と物質輸送活性の 1 分子同時計測技術を新規開発し、構造と機能の相関関係を直接的に解明にすることを目的とする。

生体膜上には様々なイオンや分子を輸送する膜タンパク質(膜輸送体)が存在し、人間を含む生物が生存する上で必要とされる恒常的な細胞内外の環境を維持している。近年、様々な疾患が膜輸送体の遺伝子異常によって引き起こされることが明らかにされつつあり、各々が持つ機能だけでなくその作動機構を同時に解明することが必要となっている。現在、それら作動機構を解明するにあたり、立体構造解析、構造変化のダイナミクス計測、生化学計測などによる多領域にわたる研究がなさ

れているが、それらは個々に独立しており、作動機構の根底をなす構造と機能の相関関係を理解するためには、研究領域をつなぐ融合研究が必要であった。そこで、本研究では、1 分子計測法に立脚した構造変化のダイナミクスと物質輸送活性の同時計測技術を新規開発し、膜輸送体の構造と機能の相関関係を直接的に明らかにしようと考えている(図 1)。

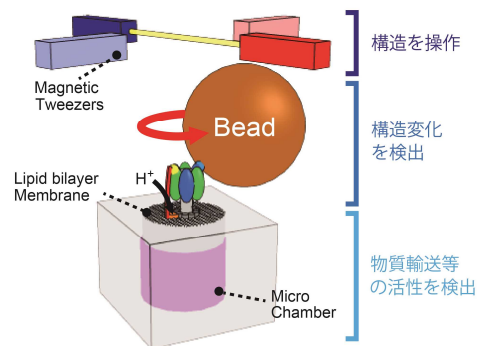


図 1 本研究のコンセプト

具体的な測定対象には、F 型 ATP 合成酵素(F_0F_1)などの膜輸送体を用いる。 F_0F_1 は回転運動によってプロトンの輸送や ATP の合成を行う膜タンパク質であり、生理的な重要性和回転分子モーターとしての興味深い性質から、作動原理の解明が強く望まれている。 F_0F_1 は、脂質膜に再構成した状態でその構造変化(回転運動)が直接可視化された数少ない膜タンパク質であり、プロトンの輸送と共役した回転運動の可視化は、私達によって達成されたばかりである。また、マイクロデバイスを利用した生体反応の 1 分子計測法も近年開発されており、それらを融合することによって、1 分子レベルで構造変化のダイナミクスと物質輸送活性を同時に計測できると考えている。そして、それらの 1 分子計測から F_0F_1 の構造と機能の相関関係を直接的に理解したいと考えている。

2. 研究成果

(1) 概要

マイクロ分析化学、1 分子生物物理学の学際融合により、膜輸送体のための新しい 1 分子計測技術を開発した。具体的には、生体膜が高度に集積化されたマイクロリアクターチップ（生体膜チップ）を自主開発し、膜輸送体の輸送機能と構造変化を 1 分子単位で計測するための技術基盤を確立した。また、本基礎研究の延長として、当該技術の応用展開を目指し、創薬や医療に資する新しいマイクロ分析システムなどの開発も行った。

(2) 詳細

i) 膜輸送体のための 1 分子計測基盤の確立

膜輸送体の入力と出力およびそれらを仲介する構造変化を 1 分子計測・制御できる技術基盤を確立した。以下に詳細を示す。

・生体膜チップ(ALBiC)を利用した出力(物質輸送)の 1 分子計測技術の開発

従来、感度の不足から、多くの膜輸送体の物質輸送を計測することが困難であり、高感度な輸送計測システムの開発は長年の課題であった。そこで、私は、従来、水溶性分子の高感度分析に利用されてきたマイクロリアクターチップを発展させた生体膜チップ”ALBiC”を開発した(図 1)。私が自主開発した ALBiC では、生体膜で密閉したマイクロリアクター(容積: 7 fL)が約 10 万個集積化されており、マイクロリアクターを利用した高感度な物質輸送計測だけでなく、リアクターを並列利用することでハイスループットな計測を実現している。当該技術を利用すると、従来のパッチクランプ法と比較して物質輸送の検出感度が約 100 万倍向上し、輸送速度が遅い膜輸送体(例えば、トランスポーター)に関しても、1 分子計測が可能となった。

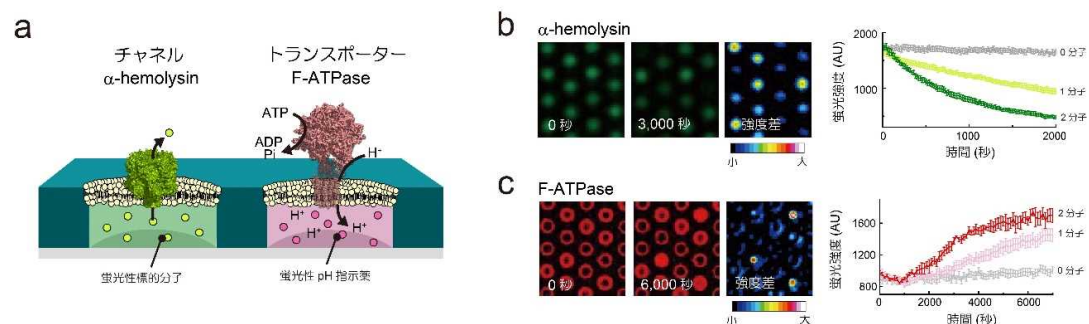


図 1 生体膜チップを利用した膜輸送体の 1 分子輸送計測
(a)1 分子計測系模式図、(b) 膜輸送体の 1 分子輸送計測結果

更に、自主開発した ALBiC の膜輸送体研究における汎用性を拡張させるため、①世界最小のリアクター、②脂質組成の非対称な生体膜を実装した新型の ALBiC を開発した(図 2)。世界最小のリアクターを実装した ALBiC(aL-ALBiC)では、マイクロリアクターの容積が約 200 aL であり、これは大腸菌の容積とほぼ同等である。ちなみに、aL-ALBiC を利用すると、従来の ALBiC よりも約 15 倍検出感度が向上している。また、非対称な生体膜を実装した ALBiC(非対称膜 ALBiC)では、細胞膜の特徴である内外層の脂質組成の非対称性を再現している。そのため、より細胞環境に近い状況での膜輸送体の機能解析が実現するものと考えている。

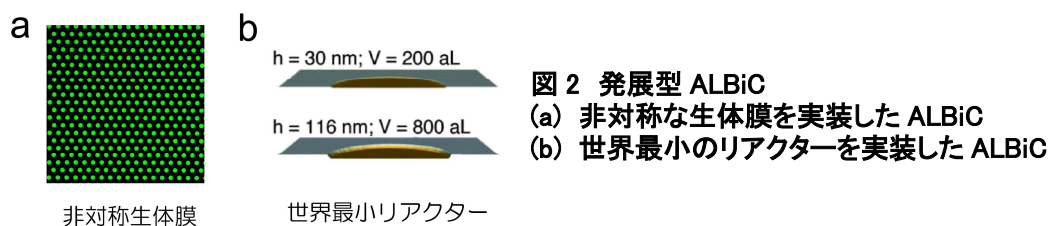


図 2 発展型 ALBiC

(a) 非対称な生体膜を実装した ALBiC

(b) 世界最小のリアクターを実装した ALBiC

・金ナノ電極を実装した ALBiC による入力(膜電位)の制御技術の開発

膜輸送体の多くは膜電位差によって機能する。そのため、膜電位差の制御装置を実装することができれば、膜輸送体の研究における ALBiC の汎用性を大幅に拡張することが可能となる。そこで、私は、膜電位差を制御する金ナノ電極を実装した ALBiC (el-ALBiC)を開発した(図 3)。el-ALBiC は、従来困難であった長時間にわたる膜電位差の制御が可能であり、そのため、膜電位差で機能する膜輸送体の高感度機能解析を実現した。

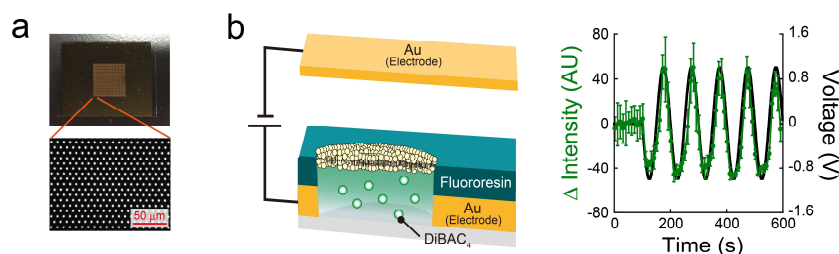


図 3 金ナノ電極を実装した ALBiC

(a)チップの写真、(b) 金ナノ電極による膜電位差の制御

・ALBiC を基盤とした構造変化の 1 分子計測技術の開発

トランスポーターなどの膜輸送体は構造変化と共役して分子を輸送する。そのため、構造変化を可視化することができれば、輸送の作動機序の大きな理解につながる。そこで、私は、膜輸送体である F-ATPase を測定対象とし、その構造変化(回転運動)を ALBiC 上で 1 分子計測する技術を開発した。現在までに、F-ATPase が ATP 加水分解を駆動力として、反時計方向に回転している様子を観察することが可能となり、今後は他の膜輸送体の計測にも利用できると考えている。

ii) 1 分子計測技術の創薬や医療への応用展開

・薬物の生体膜透過性の高感度検出チップの開発

生体膜を介した薬物の透過は、創薬において重要な指標である。そこで、私は、ALBiC の汎用性を薬物の生体膜透過計測に拡張すべく、生体膜の両側に反応容器を配置したチップ(DIB-ALBiC)を新規開発した(図 4)。DIB-ALBiC を用いて薬物の生体膜透過計測を行ったところ、人工生体膜を実装したシステムであるに関わらず、細胞膜とほぼ同等の物性を保持しており、すなわち、DIB-ALBiC は、薬物の生体膜透過計測に最適なプラットフォームであることが判明した。

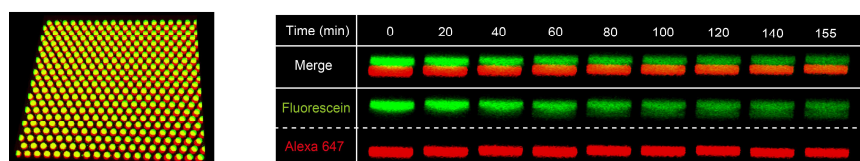


図 4 DIB-ALBiC による薬物の膜透過計測

3. 今後の展開

本さがけ研究を通じて、膜輸送体の構造・機能を1分子単位で計測・制御するための新規技術の開発に成功した。今後は、これらの新規技術群を融合・発展させることで、膜輸送体の基礎研究を推進するだけでなく、創薬・医療に資するバイオ分析装置への応用発展などの社会還元が強く期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究では、当初の研究目標を大きく超え、様々な新規技術の開発を成功に導くことができた。これは、領域内および領域外のさがけ/CREST 研究者との共同研究による成果であり、研究者として大変喜ばしく思う。今後は、共同研究を加速させ、本さがけ研究を基盤とした膜タンパク質の基礎・応用研究の更なる発展を目指してゆきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

人工生体膜マイクロチップを新規開発し、輸送速度が極めて遅いトランスポータの1分子機能解析、人工生体膜の外側、内側の脂質組成の非対称化、膜電位操作法として金ナノ電極を実装した人工生体膜マイクロチップの開発(パッチクランプ、イオン拡散電位の代替技術)、人工生体膜マイクロチップ上に F1-ATPase を再構成することによる構造変化の1分子観察 等数多くの技術開発に成功した、

人口生体膜チップの開発は、これからの応用研究のみならず、基礎研究のためにも大きな意義を持つものであり、高く評価される。チップの技術開発だけでなく、それを用いてトランスポータの活性を実際に測る等は大きな成果である。

今後、人工生体膜チップ技術を活用して生命科学上の課題を解決できるケースが多々で
てくられると思われる。その課題を抱える研究者が実際に人工生体膜チップ技術を使いこな
せるかがポイントなので、他の人が使えるように尽力していただきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. <u>*Watanabe, R.</u> , Soga, N., Ohdate, S., & *Noji, H. “Single molecule analysis of membrane transporter activity by using a microsystem” <i>Methods in Molecular Biology</i> (in press)	
2. <u>*Watanabe, R.</u> , Soga, N., Hara, M., & *Noji, H. “Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis” <i>Lab on a Chip</i> (2016) 16, 3043–3048	
3. <u>*Watanabe, R.</u> , Soga, N., & *Noji, H. “Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity” <i>IEEE Transactions on Nanotechnology</i> (2016) 15, 70–73	
4. Soga, N., <u>*Watanabe, R.</u> , & *Noji, H. “Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters” <i>Scientific Reports</i> (2015) 5, 11025	
5. <u>*Watanabe, R.</u> , Soga, N., Yamanaka, T., & *Noji, H. “High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition” <i>Scientific Reports</i> (2014) 4, 7076	
6. <u>*Watanabe, R.</u> , Soga, N., Fujita, D., Tabata, K. V., Yamauchi, L., Kim, SH., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., *Suga, H., & *Noji, H. “Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity” <i>Nature Communications</i> (2014b) 5, 4519	

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

1.

発 明 者: 渡邊力也, 大舘真也, 曾我直樹, 野地博行

発明の名称: 脂質膜非透過性指示薬

出 願 人: 東京大学

出 願 日: 2015 年 10 月 14 日

出 願 番 号: 特願 2015-202821

2.

発 明 者: 渡邊力也, 曾我直樹, 野地博行

発明の名称: 高密度微小チャンバアレイおよびこれを用いた測定方法

出 願 人: JST

出 願 日: 2015 年 6 月 8 日

出 願 番 号: 特願 2015-116045

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 主要な学会発表(招待講演)

1. <u>渡邊力也</u> “マイクロチップが実現する膜輸送体の高感度構造機能解析” 第 39 回日本分子生物学会年会 指定シンポジウム「膜タンパク質の構造ダイナミクスと機能発現」 Dec 2 (2016), Yokohama, Japan
2. <u>Watanabe, R.</u> “Artificial cell-membrane microsystems for highly sensitive analysis of membrane proteins” <i>Cold Spring Harbor Conferences Asia “Synthetic Biology”</i> Nov 28 (2016), Suzhou, China

3. 渡邊力也 “Single molecule analysis of F_0F_1 -ATP synthase”
第 54 回日本生物物理学会年会 シンポジウム「モーターと細胞骨格の新展開」
Nov 25 (2016), Tsukuba, Japan
4. 渡邊力也 “マイクロデバイスを利用した膜局在型回転分子モーターの 1 分子機能解析”
第 16 回 日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「回転分子モーターを調べてつくって理解する」Jun 9 (2016), Fukuoka, Japan
5. 渡邊力也 “生体膜マイクロチップを利用した膜輸送体の超高感度活性イメージング”
第 370 回 CBI 学会講演会「分子イメージングと創薬」
March 3 (2016), Tokyo, Japan
6. Watanabe, R. “Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity”
15th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2015)
July 27 (2015), Rome, Italy
7. 渡邊力也 “膜タンパク質の構造変化と物質輸送の 1 分子同時計測技術の開発”
第 14 回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「構造生命科学をさががける先端的基盤技術」
June 25 (2014), Yokohama, Japan

• 受賞

1. 渡邊力也 公益財団法人アステラス病態代謝研究会 優秀発表賞 (2016)
2. Watanabe, R. RSC Lab on a Chip Emerging Investigators (2016)
3. 渡邊力也 公益財団法人長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞 (2016)
4. 渡邊力也 一般財団法人 田中貴金属記念財団 MMS 賞 (2016)
5. 渡邊力也 公益財団法人コニカミノルタ科学技術振興財団 画像科学奨励賞 優秀賞 (2016)
6. 渡邊力也 文部科学大臣表彰 若手研究者賞 (2015)
7. 渡邊力也 一般財団法人エヌエフ基金 研究開発奨励賞 優秀賞 (2014)
8. 渡邊力也 Tokyo ATPase Workshop Best Poster Award (2014)

• 著作物

1. 渡邊力也 「マイクロチップを用いて明らかにする ATP 合成酵素の作動機構」
CSJ カレントレビュー第 28 号 分子マシンの展開 第 2 章, 化学同人 (編集集中)
2. MacMillan, D., & Watanabe, R. “Biologically relevant model bilayer systems for the study of ion movement” *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (in press)
3. 渡邊力也 「容量分析・電気泳動」工学教程 分析化学 第 4 章, 第 8 章, 丸善 (編集集中)
4. 渡邊力也 「生体膜マイクロチップを利用した膜輸送体のデジタルバイオ分析」
現代化学 (2016) 7, 50–53, 化学同人

• プレスリリース

1. 膜輸送体の超高感度輸送活性計測に成功 ～創薬候補の効率的探索方法の確立を目

指して～

2. 非対称性をもつ人工生体膜の量産技術を確立

～がんやアルツハイマー病などの疾患の解明、創薬探索などの活用へ～