

平成 26 年度工学系共通経費による顕彰と研究助成 成果報告書

所 属	理工学研究科 化学工学専攻
研究者 (ふりがな)	田中祐圭 (たなか まさよし)
タイトル	生体膜の曲率制御タンパク質を用いた新規生体膜ナノワイヤー素子の創出
助 成 名	新任助教研究助成
採択金額	100万円
研究の背景	<p>生物は細胞内において、様々なタンパク質を利用することで、曲率の大きい曲面から構成される生体膜から曲率の小さい平面様構造まで多様な生体膜構造を形成している。一方でこれまでに開発されている生体膜を利用したセンサ素子は、平面状の生体膜を利用したものが大半であり、生体膜表面や内部での生体反応を精密に再現できていない可能性が指摘されている。そのため生体膜構造を厳密に制御したセンサデバイスの構築が求められている。そこで本研究では、生体膜制御技術の確立に先立って、磁性細菌と呼ばれる細胞内に発達した細胞膜構造を有する微生物の膜制御タンパク質 MamY に着目し、この膜構造制御機構の理解を進めるため脂質成分の解析を中心に研究を実施した。</p>
結果と考察	<p>磁性細菌は原核生物であるにも関わらずマグネトソームと呼ばれる細胞内膜構造を形成する微生物として注目されている。またこれまでに研究者はこのマグネトソームのプロテオーム解析から MamY タンパク質と呼ばれる脂質膜制御タンパク質の同定に成功している。このタンパク質は人工的に作製した脂質膜(リポソーム)を球形からチューブ状に変形できることが明らかになっているがそのメカニズムは不明である。そこで本研究では、このマグネトソーム膜構造に存在する脂質成分を解析し、MamY タンパク質が作用する脂質成分を同定し、その知見を基に異なる曲率を持つ脂質膜を形成する条件の検討を進めた。</p> <p>1) マグネトソーム膜構造中に存在する脂質成分のリピドミクス解析</p> <p>磁性細菌からマグネトソームを抽出・精製し、そこから Bligh & Dyer 法により得られた脂質成分をサンプルとした。これを液体クロマトグラフィーから分離される脂質成分を質量分析装置により解析することでマグネトソーム脂質のプロファイルを取得した。質量分析から得られる代表的な MS/MS マスクロマトグラムを図 1 に示す。このような解析をサンプルに対して包括的に行うことで、Phosphatidyl ethanolamine (PE)6 種、Phosphatidyl glycerol (PG)6 種、Phosphatidyl serine (PS)1 種、Cardiolipin (CL)1 種の計 14 種のリン脂質の存在が確認された。また、いずれのリン脂質においても 16:0、16:1、18:1 の脂肪酸鎖により構成されることが示された。</p> <p>2) MamY タンパク質と相互作用する脂質成分の解析</p> <p>MamY タンパク質と結合するリン脂質の探索を行うため Membrane Lipid Strips を用いた結合試験を行った (図 2)。その結果、MamY は PtdIns (3,4,5) P3、CL および Sulfatide との結合能が確認された。こ</p>

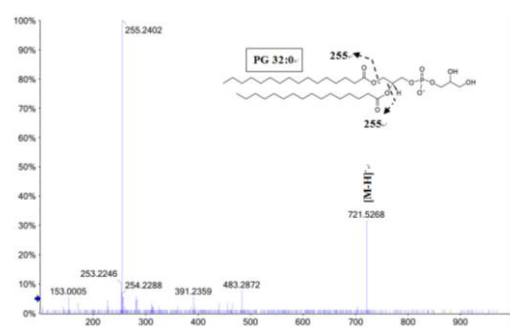


図 1 マグネトソーム脂質解析における代表的な MS/MS クロマトグラム

これらの脂質のうちマグネトソーム膜脂質成分として同定された CL が *M. magneticum* AMB-1 中の MamY タンパク質と相互作用していることが示唆された。これまでに大腸菌などの原核生物の細胞膜構造制御に必要な細胞分裂機構に、CL と脂質結合性タンパク質の相互作用が重要であることが示唆されている。以上のこ

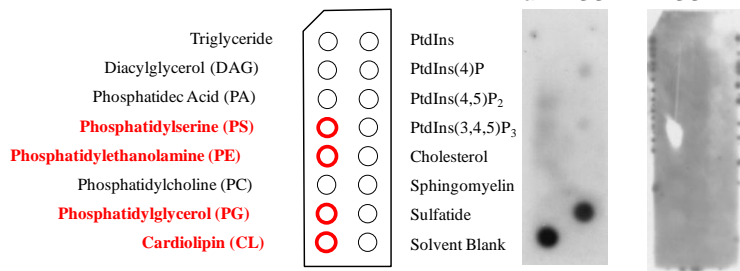


図 2 MamY タンパク質とリン脂質の結合解析
 左図に示される各脂質がメンブランに塗布されている。赤で示された脂質はリポドミクス解析により同定された脂質。抗 GST 抗体により結合タンパク質を検出

とから磁性細菌内における細胞内膜構造の制御には、CL と MamY タンパク質の相互作用が重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに現在までにリポソーム中に CL を添加することで、リポソームの MamY による曲率制御をより効率的に実施可能であることが示唆される結果が得られていることから、センサ素子の被覆に有用な技術として利用できると期待される。

3) 金ナノワイヤーの合成

上記までに得られている脂質膜をバイオセンサに適用するため、すでに報告のある金ナノワイヤーの合成とそのキャラクタリゼーションを試みた(Chem. Commun., 2009, 15, 1984-6)。その結果、長さ数 μm、太さ 3 nm 程度の均一なナノワイヤーを合成可能であることが示された(図3)。現在ここで得られたナノワイヤーと MamY タンパク質により得られる脂質チューブとのハイブリッド材料の合成法を検討している。

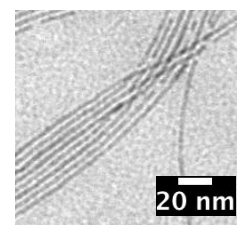


図 3 合成された金ナノワイヤーの透過型電子顕微鏡像

結論と今後の課題

本研究により、原核生物が持つ小胞形成タンパク質のタンパク質と脂質膜との相互作用について、そのメカニズムの理解が深まっただけでなく、効率的な脂質チューブ合成に向けた知見が取得できた。またバイオセンサに利用するための金属ナノワイヤーの合成にも成功したことから、今後これを組み合わせることで、曲率を制御した生体膜を持ったバイオセンサデバイスが構築可能となることが期待される。

使用内訳書

費目	内訳	金額
備品 1		
備品 2		
消耗品	コロジオン貼付メッシュなど	786,179 円
旅費	共同研究打ち合わせ (名古屋大学)	36,680 円
その他	大岡山分析支援センター利用料 など	177,141 円
合計		1,000,000 円

記入上の注意：

備品は、品名ごとに記入。
 差額が生じた場合は、消耗品で調整。
 消耗品を購入しなかった場合は、経費の差額と補填した予算科目名を合計額の内訳欄に記入。