

膜タンパク質の脂質膜への再構成と ナノバイオデバイス創出への挑戦

膜タンパク質は、生体膜である脂質膜に埋め込まれた状態で機能を発現しています。したがって、膜タンパク質の機能を利用したデバイス、ナノバイオデバイスの創出のためには、精製した膜タンパク質を脂質膜へ再構成するなど、さまざまな要素技術が必要です。本稿では、膜タンパク質の脂質膜への再構成と、それを含めたナノバイオデバイスの創出に向けた挑戦について紹介します。

かさい なほこ すみとも こうじ
河西 奈保子 / 住友 弘二

NTT物性科学基礎研究所

膜タンパク質とバイオデバイス

近年、微細加工・微小計測技術の飛躍的な向上により、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーが融合する分野が新しい研究分野、大きな市場として注目されています。その融合分野の中では、ナノテクノロジーを用いて疾病の診断・治療を行ったり、新しい生体機能の解明の試みを行うだけでなく、バイオの機能を有するナノメートルサイズの素子（ナノバイオデバイス）の創出も可能となってきています。生体の持つ高効率で優れた機能を利用したナノバイオデバイスは、医療や創薬、サイエンスとしての新しい研究対象として関心を持たれています。

一方、膜タンパク質は生体膜である脂質膜に付着あるいは貫通して機能しているタンパク質で、細胞膜の重量のほぼ50%が膜タンパク質です。膜タンパク質には、神経伝達物質などの信号分子を受け取る受容体タンパク質、およびエネルギーを使ってイオンなどを輸送するトランスポーター（ともに膜貫通型膜タンパク質）、細胞膜の表面に結合して細胞どうしを結合する接着性タンパク質、および膜と相互作用を持つ膜結合性タンパク質（ともに表在

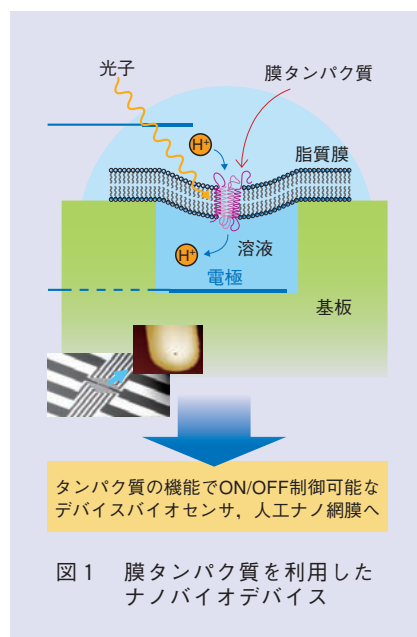
型膜タンパク質）などがあります。

膜貫通型膜タンパク質である受容体タンパク質（受容体）は、イオンチャンネル型受容体とGタンパク共役型（代謝型）受容体とに大別されます。そのうちイオンチャンネル型受容体はリガンド結合などにより受容体の構造変化が起こって、イオンチャンネルが開くことによりイオンが細胞内へ流入し電位変化を誘起して情報伝達を行います。生体内での情報伝達は生命の維持に不可欠で、情報伝達の異常はさまざまな疾病の原因になります。受容体タンパク質・膜タンパク質は、生体機能と密接な関係がある高機能・超小型の素子であるといえます。

ナノバイオデバイスの一例として、受容体タンパク質の機能を利用したセンサチップを考えることができます。その概念図を図1に示します。精製した受容体タンパク質を人工脂質膜へ再構成、つまり再度埋め込むことによって、受容体タンパク質が生体内と類似の反応をすることができます。さらに、使用する受容体タンパク質の数や種類を制御することで、多機能である優れたナノバイオデバイスが可能になると考えられます。生体分子の機能を利用してON/OFF可能な超小型のデバイス

が実現すれば、超小型のセンサを生体内に埋め込むことで生体機能を補助することが可能となってきます。

NTT物性科学基礎研究所では、生体機能を有する分子である受容体タンパク質に着目し、ナノバイオデバイス創製を目標にした研究を行っています。ナノバイオデバイスの実現のためには、タンパク質など10 nm程度の大きさの分子を組み合わせて集積化することが必要になってきます。そのためには、いくつかの要素技術の獲得が必要です。例えば分子のマニピュレーション、分



子の観察，分子の配列・配向制御，膜タンパク質の脂質膜への再構成，生体分子の活性の保持，生体分子との相性のよい材料の選択などが挙げられます。これらの基礎的な技術の取得がナノバイオデバイス創出の第一歩となると考えています。

受容体タンパク質の精製と再構成

受容体タンパク質は，通常，生物の組織や培養細胞から精製します。精製作業中はできるだけ試料を4℃に保って操作します。精製は，得られた細胞を破碎した後超遠心分離機を用いて膜とされる分画を分取し，続いて界面活性剤を用いて可溶化します。この溶出した分画をカラムで精製します。具体的な条件はタンパク質それぞれによって異なります。

通常，受容体タンパク質である膜タンパク質は，複数のサブユニットから構成されていますが，そのサブユニットはさらに大きく分けて3つ，細胞外ドメイン，細胞内ドメイン，膜貫通ドメインに分けられます。精製した受容体タンパク質を脂質膜中へ再構成することによって，受容体タンパク質は一定の向きを保ち機能を発現することができます。

再構成にはいくつかの方法⁽¹⁾がありますが，いずれも，タンパク質・脂質・界面活性剤を混合し，徐々に界面活性剤を除去するというもので，得られるのは受容体タンパク質を含むリポソーム，プロテオリポソームです。これは球状の脂質二重膜で，受容体タンパク質が埋め込まれています。デバ

イスに用いる場合は，基板もしくは構造体の上に展開して，所望のデバイスを作製することができると考えられます。

再構成後の受容体タンパク質の観察

これまで，受容体タンパク質の構造の観察には，主にX線結晶構造解析法による結晶構造解析，クライオ電子顕微鏡法によるタンパク質一分子構造観察が行われてきました^{(2)~(4)}。これらの方法は空間分解能が高い手法ですが，活性を持つタンパク質の構造変化を逐次観察するには適していません。

一方，10~20 nmの大きさのタンパク質一分子を溶液中で観察することができる測定機器として原子間力顕微鏡

(AFM)があります。これまでの方法と違い，AFMは最適な生理的環境下でのタンパク質の構造観察や分子の動的観察ができます⁽⁵⁾。タンパク質のAFMによる構造観察は1990年代後半からEngelのグループなどを中心に積極的に行われるようになってきています⁽⁶⁾。

精製後のタンパク質を含む試料と，さらに透析により再構成まで行ったタンパク質を含む試料のAFMによる観察を行うと，図2 (a)，(b)のような像を得ます。基板上に静置した精製後のタンパク質を含む試料(図2 (a))では，基板(濃い茶色に見える部分)上に4 nm程度の高さの平らな小さいドメイン(黄土色に見える部分)と，やや高

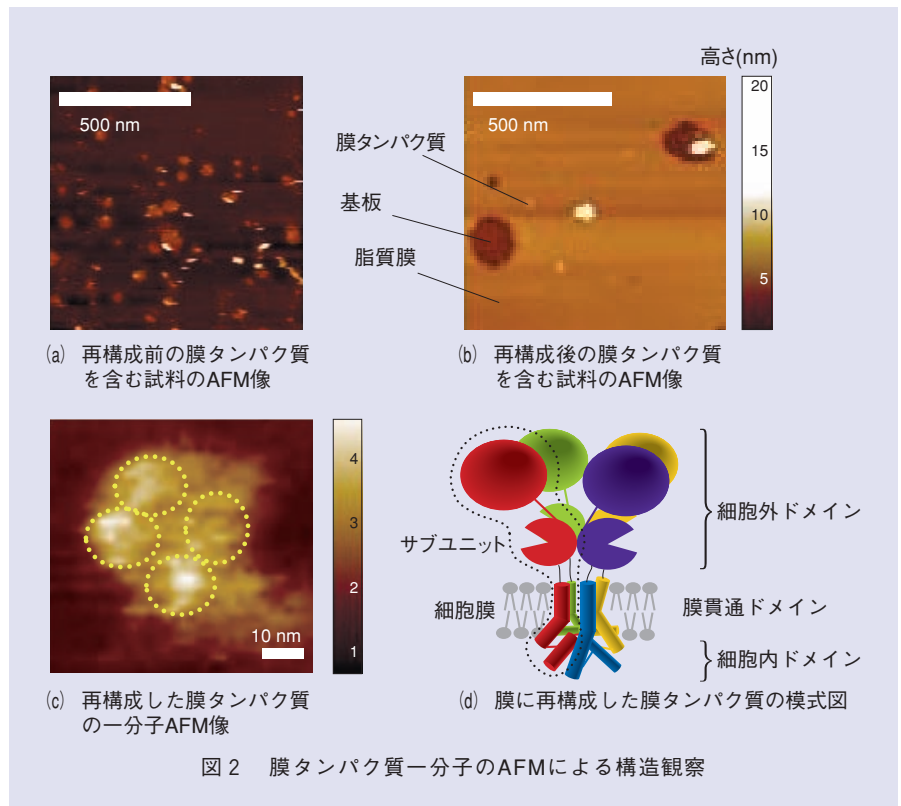


図2 膜タンパク質一分子のAFMによる構造観察

さのある構造物（白色に見える部分）が複数観察されました。一方、精製後に再構成した場合（図2 (b)）では広い面積に形成された高さ4 nmの平坦な膜（黄土色に見える部分）と、その中に高さ2~10 nm、直径数十nmの大きさの点状の構造物（白色に見える部分）を観察することができました。4 nmの平坦な膜は脂質二分子膜で、白色に観察された構造物は膜タンパク質です。再構成することによって広い脂質膜の中央部に再構成されたタンパク質が観察できました。

ここでさまざまな大きさのタンパク質が観察されたことは、再構成後の試料中のタンパク質は単離したものと凝集したもの、脂質膜表面に吸着しているものが混在していることを示唆しています。抗体反応による確認から高さ2~3 nm、大きさ20~30 nmの構造物が一分子の受容体タンパク質であると判断でき、高さが2~3 nmであるタンパク質の構造観察を行いました。

得られた一分子AFM像では平坦な脂質二分子膜上に4つの構造物が観察されました（図2 (c)）。この受容体タンパク質が、図2 (d)の模式図で示されるように四量体構造をしていることから、それぞれのサブユニットが観察されたと考えられます。観察された構造物は脂質膜に再構成した受容体タンパク質が細胞外ドメインを上向きにした状態であると予想されます。

AFMにより、活性を有した状態の受容体タンパク質を一分子レベルで観察することができれば、今後、その構造と機能との関連を一分子でとらえる

ことができると考えられます。

ナノバイオデバイス創出への試み

図1に示すようなデバイスを構築するためには、ナノスケールの微小孔をカバーするように膜タンパク質を含んだ脂質膜を配置する必要があります。また、膜タンパク質が設計どおりデバイス構造に配置されていることを確認するためにも、そのような微小孔の上でのAFMによる分子スケールでの観察が求められます。

紫膜をSi（シリコン）基板に形成した直径100 nmの孔パターン上でAFM観察した結果を図3に示します。紫膜とは、脂質二分子膜の中に、光感受

性のプロトンポンプである膜タンパク質（バクテリオロドプシン）を含んだ膜です。網膜に存在するタンパク質と同様の機能を持つ物で、光に反応するバイオデバイスの材料としても期待されます。

膜の中でタンパク質は、図3 (a)、(b)に示すように、三量体を形成し、それらが六角形をつくるように詰まった二次元結晶を構成しています。Si基板に吸着した紫膜が、一部の孔を覆っていることが分かります。断面図（図3 (d)）からは、観察時にAFM探針が紫膜を上から押すために、紫膜は少したわんでしまうものの、孔の内部と外部を完全に遮断するように覆っていることが分かります。このように、紫膜

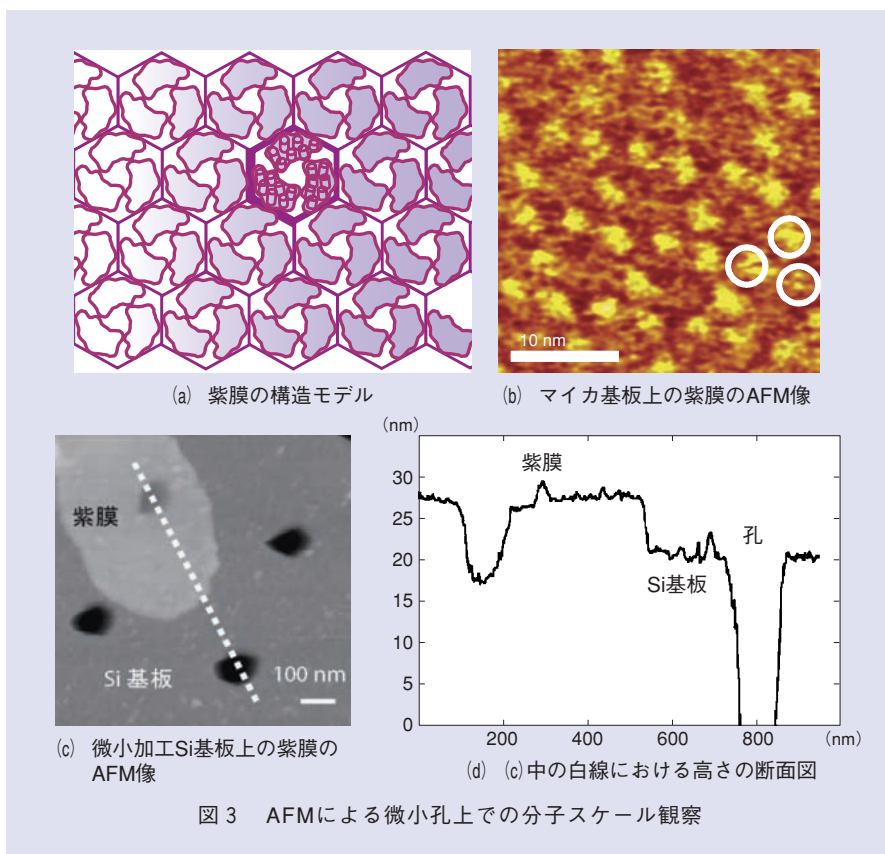


図3 AFMによる微小孔上での分子スケール観察

のような生体膜は非常に柔らかく変形しやすいにもかかわらず、AFM測定条件を選んで探針の影響を極力小さくすることで、デバイス構造に配置された膜タンパク質を観察することが可能になってきます。ここではタンパク質が二次元結晶を構成する紫膜を例に示しましたが、前述したような、人工脂質膜に再構成した受容体タンパク質においても同様の測定は期待できます。

一方、このように微小な孔を覆った脂質膜は、まさに細胞膜の一部であると見なすことができます。通常のAFM観察では、試料を基板に固定して観察するのに対して、より生体内に近い自然な条件で、膜の中に入っているタンパク質は基板と接触することなく観察することを可能にしています。膜そのものの機械的特性も、基板の影響を受けることなく定量的に求めることも可能です⁽⁷⁾。必要に応じて、脂質膜で覆われた小孔内部の溶液と外部の溶液を変え、細胞内外の溶液条件の違いをつくり出せば、より生体内の環境に近づけることができます。今後、このような環境で、AFMによる構造解析と電気測定や蛍光観察を用いた膜タンパク質の機能解析を同時に行えるようになれば、構造と機能の関連の理解が進むと期待されます。

ナノバイオデバイスが実現すれば

NTT物性科学基礎研究所では受容体タンパク質の機能を利用したデバイスの創製を目指した研究を行っています。この研究は一部オックスフォード大学との共同研究として遂行されてい

ます。単一の受容体タンパク質のAFMによる構造観察は、溶液中で機能を保持した受容体タンパク質の構造を観察でき、これまで得られなかった受容体タンパク質の応答特性や構造変化の詳細についての知見を得られるものと考えています。

受容体タンパク質の機能に基づいたナノバイオデバイスの実現により、超小型なセンサが構築できます。神経伝達物質のセンサであれば生体へ埋め込めるかもしないと考えています。

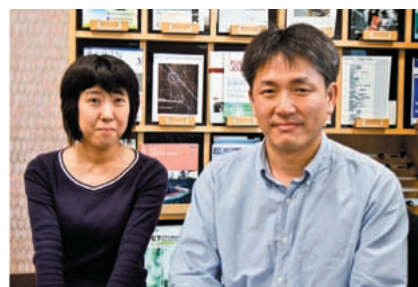
上述したように、受容体タンパク質をデバイス作製へ向けて応用する場合、さまざまな要素技術が必要となります。NTT物性科学基礎研究所ではタンパク質の配列制御やタンパク質の輸送というような研究も同時に行っています⁽⁸⁾。今後はこれらを組み合わせ、さらなる研究の発展が期待されています。

■参考文献

- (1) A.M. Seddon, P. Curnow, and P.J. Booth: "Membrane proteins, lipid and detergents: not just a soap opera," *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1666, pp.105-117, 2004.
- (2) M. Safferling, W. Tichelaar, G.n. Kümmerle, A. Jouppila, A. Kuusinen, K. Keinänen, and D.R. Madden: "First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers," *Biochemistry*, Vol.40, pp.13948-13953, 2001.
- (3) K. Hamada, A. Terauchi, and K. Mikoshiba: "Three-dimensional Rearrangements within Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Calcium," *J. Biol. Chem.*, Vol.278, pp.52881-52889, 2003.
- (4) T. Nakagawa, Y. Cheng, E. Ramm, M. Sheng, and T. Walz: "Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes," *Nature*, Vol.433, pp.545-549, 2005.
- (5) S. Kasas, N.H. Thomson, B.L. Smith, H.G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E.T. Kool, M. Kashlev, and P.K. Hansma: "Escherichia coli RNA Polymerase Activity Observed Using Atomic Force Microscopy,"

Biochemistry, Vol.36, No.3, pp.461-468, 1997.

- (6) A. Engel and D.J. Müller: "Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope," *Nat. Struct. Biol.*, Vol. 7, pp.715-718, 2000.
- (7) A.M. Siitonen, K. Sumitomo, C.S. Ramanujan, Y. Shinozaki, N. Kasai, K. Furukawa, J.F. Ryan, and K. Torimitsu: "Elastic modulus of suspended purple membrane measured by atomic force microscopy," *Appl. Surf. Sci.*, Vol.254, pp.7877-7880, 2008.
- (8) C.S. Ramanujan, K. Sumitomo, M.R.R.d. Planque, H. Hibino, K. Torimitsu, and J.F. Ryan: "Self-assembly of vesicle nanoarrays on Si: A potential route to high-density functional protein arrays," *Appl. Phys. Lett.*, Vol.90, p.033901, 2007.



(左から) 河西 奈保子 / 住友 弘二

ナノバイオデバイスは生活や社会を大きく変える可能性が十分あります。これからモノバイオデバイスの創出に向けてさまざまな方向からの取り組みを続けていきます。

◆問い合わせ先

NTT物性科学基礎研究所
機能物質科学研究部
分子生体機能研究グループ
TEL 046-240-3535
FAX 046-270-2364
E-mail nahoko@nttbl.jp