

様 式 F-7-2

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実績報告書（研究実績報告書）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	1 4 6 0 3
研究 代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	博士研究員		
	氏名	春山 隆充		

1. 研究種目名 挑戦的研究（萌芽） 2. 課題番号 17K19528

3. 研究課題名 蛋白質の膜透過の力を測る

4. 補助事業期間 平成29年度～平成30年度

5. 研究実績の概要

本研究の目的は、基本的な生命現象の一つである蛋白質の膜透過の力を高速原子間力顕微鏡(高速AFM)で測ることである。原核生物の膜透過反応は蛋白質膜透過チャネルであるSecYEG複合体を介して起こり、SecA ATPaseが基質蛋白質と相互作用しながら、ATP加水分解を伴う構造変化をすることで駆動される。膜透過反応の力学的特性を評価するために、ナノディスク(ND)とSecY-SecA融合蛋白質を用いてSecYAEG-NDを構築した。SecYの細胞外側をビオチン標識し、測定基板にストレプトアビジン(STV)を用いることで、SecYAEG-NDの膜表面が測定基板に対して水平となり、SecAが上部に位置する向きでの固定が可能となった。前年度は測定基板としてSTV二次元結晶を用いていたが、結晶の調製が煩雑であることなどの問題があったので改めて基板を検討した。検討の過程で、マイカ基板ではSecYAEG-NDの膜表面が基板に対して垂直となり、SecYAEG-NDが横たわった状態で固定できることを発見した。これにより、膜蛋白質を二方向から高速AFM観察することが可能となり、新たな手法として査読付き学術誌に報告した。一方、問題点は基板をビオチン-OSuで修飾し、STVを介してSecYAEG-NDを基板に固定することで改善された。次に、カンチレバーに結合可能な基質蛋白質(proOmpA)の調製に取り組んだ。アミノシラン処理したカンチレバーを、グルタルアルデヒドを介してproOmpAと架橋するために、リジンから成るポリペプチド鎖を持つGFPを付加したproOmpAの発現系を構築した。proOmpAをunfoldした紐状の状態を得るために尿素存在下で精製したところ、高純度の精製産物を得た。今後は、精製したproOmpAと修飾したカンチレバーを架橋したものをを用いて、膜透過の力を測定する予定である。

6. キーワード

高速原子間力顕微鏡 膜タンパク質 ナノディスク

7. 研究発表

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haruyama Takamitsu, Sugano Yasunori, Kodera Noriyuki, Uchihashi Takayuki, Ando Toshio, Tanaka Yoshiki, Konno Hiroki, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 27
2. 論文標題 Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 152～160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2018.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

2 版

1. 著者名 Haruyama Takamitsu, Uchihashi Takayuki, Yamada Yutaro, Kodera Noriyuki, Ando Toshio, Konno Hiroki	4. 巻 430
2. 論文標題 Negatively Charged Lipids Are Essential for Functional and Structural Switch of Human 2-Cys Peroxiredoxin II	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 602～610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2017.12.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

1. 著者名 Tanaka Yoshiki, Izumioka Akiya, Abdul Hamid Aisyah, Fujii Akira, Haruyama Takamitsu, Furukawa Arata, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 505
2. 論文標題 2.8-A crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 141～145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takamitsu Haruyama, Yasunori Sugano, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki
2. 発表標題 High-speed AFM imaging of membrane protein embedded in Nanodisc
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春山隆充、菅野泰功、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、田中良樹、紺野宏記、塚崎智也
2. 発表標題 ナノディスクに再構成した膜タンパク質の高速AFM観察
3. 学会等名 第15回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takamitsu Haruyama, Yasunori Sugano, Noriyuki Kodera, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki
2. 発表標題 High-speed AFM imaging of membrane protein reconstituted in nanodisc
3. 学会等名 第18回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

8. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

9. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

10. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

—

11. 備考

—