

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	14603
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 基盤研究(C) (一般)

2. 課題番号 19K06599

3. 研究課題名 ナノディスクに再構成した膜輸送体の1ユニット高速AFM動態解析

4. 補助事業期間 令和元年度～令和元年度

5. 研究実績の概要

膜タンパク質の高速原子間力顕微鏡(高速AFM)観察は、測定基板に展開した平面脂質二重膜中で行われてきた。申請者らは、新たにナノディスク技術を高速AFM法と組み合わせることで、従来では困難であった真横(膜表面が測定基板に対して垂直になる向き)から膜タンパク質を観察する系を構築した。この測定法は、膜タンパク質による物質の膜透過・膜輸送過程のリアルタイムでの可視化に応用できる。

初めに、タンパク質の膜透過チャネルSecYEGによる基質タンパク質の膜透過反応の可視化に着手した。SecYEGとATP加水分解を伴って膜透過を駆動するSecA ATPaseを融合したタンパク質(SecYAEG)を再構成したナノディスク(SecYAEG-ND)は、マイカ基板上で横向きに配位する。当研究では、この横向きに配位したSecYAEG-NDが膜透過反応を伴って基板上を動く様子を高速AFMで観察する。動く様子を観察するにあたり、まず、基質タンパク質とSecYAEG-NDが相互作用した反応開始前の膜透過反応開始複合体を高速AFMで観察した。さらに、基質タンパク質がSecYEGの途中で停止した膜透過反応中間体と基質タンパク質が完全に膜透過してGFPによって反応が停止した膜透過反応終了複合体も観察した。

それぞれの複合体でGFPとSecAの距離が異なっていることから、SecYAEG-NDでも基質タンパク質の膜透過反応が起こることが示唆された。また、ATP存在下で、膜透過反応中のSecAを高速AFMで詳細に観察したところ、SecAが構造変化する様子が見られた。

研究期間全体(1年間)で、SecYAEG-NDが膜透過反応を行う様子を高速AFMで直接可視化できる系の構築を達成した。

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1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名	Kobayashi Mayuka, Muramatsu Kana, Haruyama Takamitsu, Uesugi Haruka, Kikuchi Ai, Konno Hiroki, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro	4. 卷
2. 論文標題	Polymerization of Oxidized DJ-1 via Noncovalent and Covalent Binding: Significance of Disulfide Bond Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名	ACS Omega	6. 最初と最後の頁 9603 ~ 9614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.9b00324		査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）		国際共著 -

1版

〔学会発表〕 計0件

〔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

高速原子間力顯微鏡によるナノディスクを用いた膜タンパク質のリアルタイム動態観察

https://bsw3.naist.jp/tsukazaki/images/contents/757/haruyama_tsukazaki.pdf