

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年 4月 30日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 大阪大学大学院基礎工学研究科  
職 名 助教  
研究代表者名 山下 隼人

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 192005 )

1. 共同利用研究 課題名	光受容タンパク質が自発的に作る2次元動的秩序構造とシグナル伝達機構の研究		
2. 共同利用研究 目的	視細胞円盤膜では光受容体ロドプシンの自発的に形成する秩序構造が光受容制御とシグナル伝達機構に寄与していると推測されているが、その形成機構やシグナル伝達機能に果たす役割を構造と動態の両面から同時に解析することはこれまで困難であった。本研究ではロドプシンが形成する2次元秩序構造を高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)で直接観察することにより、その動的分子機構を明らかにする。		
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ~ 2020年3月31日		
4. 共同利用研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 山下 隼人	大阪大学大学院基礎工学研究科	助教	高速 AFM 測定、研究の取りまとめ
(分担研究者) 干鰯谷 和彦	大阪大学大学院基礎工学研究科	修士1年	高速 AFM 測定
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究 部門・環境物質応答研究 分野	氏 名 森垣 憲一

※ 次の6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

#### 6. 共同利用研究計画

視細胞の円盤膜では、光受容膜タンパク質であるロドプシンが中心部で動的な超分子クラスターを形成し、シグナル伝達に関与していることを受入研究者である森垣准教授のグループにおいて明らかにされている。この2次元秩序構造が視細胞の1光子検出を可能にしている可能性が高いが、分子クラスター構造とその動態の両面から同時に計測することはこれまで困難であった。そこで、研究代表者が保有する高速 AFM を用いて、生体膜中でのロドプシンの動的構造状態を1分子レベルで観察することにより、シグナル伝達過程に重要な受容体の超分子クラスター構造を明らかにする。これらの分子過程の観察には、純度が高く、機能活性を維持した状態でのサンプル精製が求められる。受入研究者である森垣准教授のグループではロドプシンの機能を保ったまま精製し、人工膜へ再構成する技術の開発を行っている。そこで、そのノウハウとリソースを生かし、高速 AFM に適用可能なサンプル調整と分子構造評価を共同で行う。調製したサンプルを申請者の高速 AFM で計測を行い、2次元分子クラスターの動的構造状態を高解像度で可視化する。これにより、ロドプシンの生体膜中での動的秩序構造やクラスター構造状態を解析する。

#### 7. 共同利用研究の成果

カエル視細胞から精製した円板膜(Urea 膜)を高速 AFM で計測した結果、AFM 基板上で展開した膜断片が観察され、膜中で数十 nm 程度のロドプシンナノクラスターが観察された。N 末抗体を投与した所、抗体と考えられる分子の結合が見られたことから、円板膜の内側面が観察されたと考えられる。シグナル伝達過程は、円板膜の外側面で生じることから、この結果で示された膜表面においてシグナル伝達過程を観察することは困難である。一方で、電子顕微鏡を用いた研究で、精製円板膜の脂質を少量可溶化させた Lipid depleted membrane(LDM)の中で、2次元結晶が形成されることが報告されている。そこで、界面活性剤 Tween80 を用いて、LDM の調製を行った。膜タンパク質に対する界面活性剤の量比の条件を少しずつ変えた試料を調製し、高速 AFM 観察した結果、100nm を超える大きさの分子クラスターを生理溶液中で観察することに成功した。更に、抗体を投与した試料で LDM の調製を行ったところ、更に大きな超分子クラスターも観察され、このクラスター内でロドプシンと考えられる2量体分子が列構造を形成し、規則正しく配列している様子を高分解能で観察することに成功した。これらの構造は、シグナル伝達分子トランスデューシンが受容体であるロドプシンと相互作用する上で重要な役割を果たすと考えられ、本研究において高速 AFM を用いることで、その分子構造基盤を明らかにすることができた。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

##### 【研究論文】

- (1) Y. Kaneshige, F. Hayashi, **K. Morigaki**, Y. Tanimoto, **H. Yamashita**, M. Fujii, A. Awazu, "Affinity of rhodopsin to raft enables the aligned oligomer formation from dimers: Coarse-grained molecular dynamics simulation of disk membranes", *PLoS ONE*, 15(2) (2020)

##### 【学会発表】

- (2) **山下隼人**, **干鰯谷和彦**, 谷本泰士, **森垣憲一**, 林文夫, 阿部真之, 「光信号伝達におけるロドプシンクラスター上でのトランスデューシン動態過程の高速 AFM 観察」  
生体エネルギー研究会第 45 回討論会、九州工業大学、2019 年 12 月 21 日、P07
- (3) **干鰯谷和彦**, 谷本泰士, **山下隼人**, 林文夫, **森垣憲一**, 阿部真之、  
「ロドプシンクラスター上におけるトランスデューシン動態プロセスの高速 AFM 観察」、  
研究会「理論と実験」2019、2019 年 10 月 10~11 日、広島大学
- (4) **K. Hoshikaya**, Y. Tanimoto, **H. Yamashita**, F. Hayashi, **K. Morigaki**, M. Abe, "High-speed AFM observation of the dynamic process of transducin on rhodopsin cluster", 第 57 回生物物理学会年会、2019 年 9 月 24 日~26 日、宮崎県シーガイアコンベンションセンター、2Pos199

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

- (1) 日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究(B) (2020 年採択)  
「光受容体タンパク質が形成する超分子構造とシグナル伝達の分子動態機構の解明」  
研究代表者:**山下隼人**、研究分担者:**森垣憲一**、林文夫、栗津暁紀
- (2) トラベルグラント受賞:**干鰯谷和彦**  
第 57 回生物物理学会年会、2019 年 9 月 24 日~26 日、宮崎県シーガイアコンベンションセンター