

平成 30 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：共同研究 研究期間：平成 30 年 10 月～平成 31 年 3 月

研究課題名：高速 AFM による細胞模倣環境下における生体分子動態解析

ラボ長

所属：附属極限科学センター・先端エレクトロニクス研究部門

氏名：山下 隼人

研究成果

(研究目的)

細胞が機能し、環境と相互に作用するためには、細胞を覆う細胞膜中の膜タンパク質分子が働くことが必須であり、それぞれの細胞の多様な機能の多くは膜タンパク質が担っている(図 1 左)。このことから、細胞における個々の膜タンパク質分子が働く様子を直接観測することが出来れば、細胞の機能や個性の理解に繋がるだけでなく医学的にも重要であると考えられる。そのため、細胞上でのタンパク質の挙動・機能を調べる研究が盛んに行われているが、現在の技術では生きた細胞上の生体分子の動態を 1 分子レベルで直接観察することは依然として容易ではない。

そこで、本研究では細胞から取り出した細胞膜、もしくは膜タンパク質を再構成した脂質膜を基板平面上に展開し、先端エレクトロニクス技術である高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いて、生体膜中、膜上の生体分子の 1 分子観察を行う。また、基板平面上にナノサイズの微小穴構造を作製し、タンパク質を含有する細胞膜で覆うことで、細胞模倣環境の構築を行い、高速 AFM を用いて、機能している生体分子の 1 分子動態観察を行う(図 1 右)。これらにより、生体膜上のタンパク質分子の 1 分子挙動を可視化し、その動作メカニズムを解明することを目指す。以上を推進するため、本研究では「生体分子の高速 AFM 計測」を行っている研究代表者と「膜タンパク質の分子機能解析」を行っている川鍋(医学研究科・統合生理学教室)とで共同研究を展開した。以下に結果を示す。

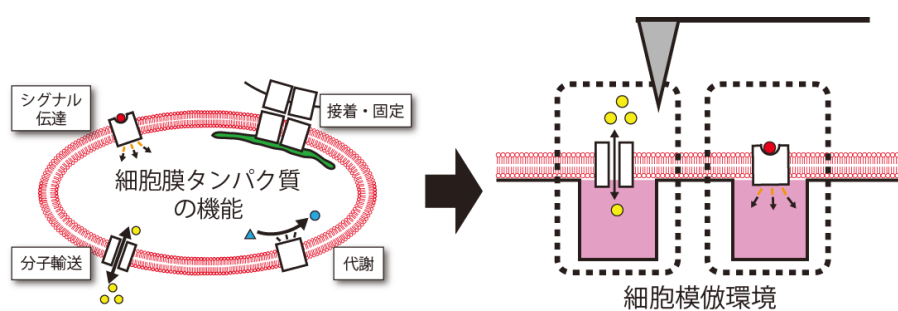


図 1:研究概念図、(左)細胞における膜タンパク質の機能、(右)高速 AFM による細胞模倣環境下でのタンパク質 1 分子イメージング

(研究結果)

【1】 ナノ微小穴基板の作製と中空膜の高速 AFM 計測

細胞模倣環境の土台となるナノ微小空間として、電子線露光装置を用いて、レジスト塗布した Si 基板上で多数のナノ微小穴構造の作製に取り組んだ(図 2(a))。

基板上的の穴配置のパターンと EB 露光条件の検討を行い、直径 100nm、ピッチ 500nm 間隔で微細加工し、基板を高速 AFM 観察した結果、深さ 100nm 程度の穴構造を観察することが出来た(図 2(b)(c))。また、作製した基板へバクテリア細胞から精製した生体膜である紫膜を展開

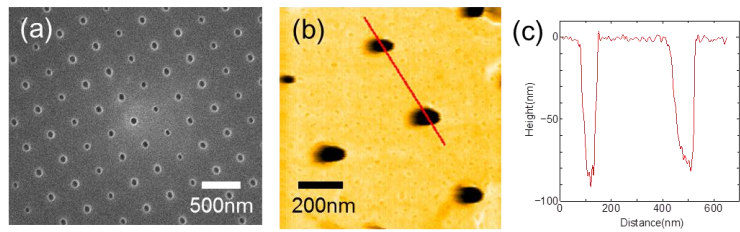


図 2:本研究で作製したナノ微小穴構造、(a)SEM 像、(b)AFM 像、(c)b の赤線部の断面プロファイル

した結果、生理溶液中でナノ微小穴を生体膜で覆うことに成功した(図 3(a))。更に高速 AFM で走査中に探針で力を印加したところ、中空膜を破裂させることが出来た(図 3(b))。このことから、実際にナノ微小穴が生体膜でふさがれていることを確認できた。

一方、高速 AFM 観察において、ナノ微小穴上の中空膜では膜が撓むことにより、膜中の膜タンパク質分子を観察する際に空間分解能が低下することが分かった。そこで、中空膜における膜タンパク質分子を高分解能で観察するのに適したナノ微小穴の条件検討を行った。Si 基板上的のレジストの膜厚を変えることで微小穴の深さ(体積)を変えたところ、ナノ微小穴空間の体積が小さいほど、膜の撓みが軽減する傾向にあることが分かった。そこで現在、これら作製した基板を用いた中空膜の高速 AFM 計測を行っており、今後、中空膜上での膜タンパク質の高分解能分子構造観察が期待できる。

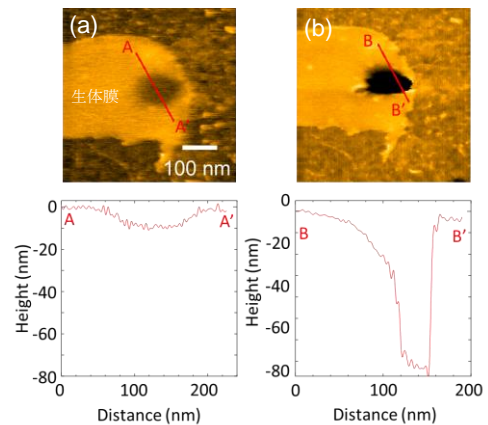


図 3: 生体膜で覆われたナノ微小穴。(a)力印加による破裂前、(b)破裂後

【2】高速 AFM 計測のための膜タンパク質試料の調製・精製および再構成

本研究では転移性乳がんが発現が確認されており、また虚血性脳障害の増悪にも関与していることが報告されている、電位依存性プロトンチャネル VSOP を医学的に重要な膜タンパク質ターゲットの一つとして AFM 計測を行う。本年度は、哺乳類培養細胞において VSOP を発現させサンプルを得て迅速に評価する手法の確立を目指して試料調製を試みた。VSOP をはじめとする膜タンパク質は細胞内外の環境に応じて機能するため、脂質膜へ再構成する際にその配向性が重要となる。そこで配向性を確認できるようにするため、VSOP の細胞内側および外側の両部位に異なるタグをつけて発現を行った。また発現させた VSOP チャンネルが実際に機能していることを確認するために、パッチクランプでチャンネル電流測定を行った。その結果、野生型と同様のチャンネル電流を計測することができた。このことから、タグの付加による機能への影響がほとんどないことを確認できた。また、このコンストラクトを用いて発現・精製・可溶化した VSOP サンプルを人工脂質膜へ再構成することで、高速 AFM 計測を行うための試料を調製することが出来た。そこで今後このサンプルを用いて高速 AFM による 1 分子動態計測を進めていく。

キーワード：

高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)、膜タンパク質、1 分子動態

研究経費（H30 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
266,080 円	591,790 円	2,130 円	0 円	0 円	860,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

川鍋陽・大阪大学医学研究科統合生理学教室

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

荒木佑進・大阪大学基礎工学研究科博士前期(修士)課程 2 年

発表論文等（平成 31 年 3 月 31 日現在）

【雑誌論文】

1. **A. Kawanabe**, M. Hashimoto, M. Nishizawa, K. Nishizawa, H. Narita, T. Yonezawa, Y. Jinno, S. Sakata, A. Nakagawa and Y. Okamura, "The hydrophobic nature of a novel membrane interface regulates the enzyme activity of a voltage-sensing phosphatase" *eLife* 7, e41653 (2018)
2. M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe, **H. Yamashita**, "Control of surface potential and hydroxyapatite formation on TiO₂ scales containing nitrogen-related defects", *Acta Materialia*, Vol.155, 379-385 (2018)
3. H. Kashida, Y. Hattori, K. Tazoe, T. Inoue, K. Nishikawa, K. Ishii, S. Uchiyama, **H. Yamashita**, M. Abe, Y. Kamiya, H. Asanuma, "Bifacial nucleobases for hexaplex formation in aqueous solution", *Journal of the American Chemical Society*, Vol.4, 8456-8462 (2018)

【著書】（総説）

Y. Okamura, **A. Kawanabe**, T. Kawai, "Voltage-Sensing Phosphatases", *Biophysics, Physiology and Engineering Physiological reviews*, 98(4), 2097–2131, (2018)

【学会発表】

【招待講演】

1. **山下隼人**、「生細胞膜分子動態を観る極限時空間分解能 AFM の創成」、日本化学会第 99 春季年会(2019)コラボレーション企画、甲南大学岡本キャンパス、2019 年 3 月 17 日
2. **山下隼人**、「生体分子のナノ動態を可視化する高速原子間力顕微鏡」、ナノ技術応用分科会講演

会、グランフロント大阪北館、2019年2月22日

【口頭発表】

1. 石原浩行、若家富士男、村上勝久、長尾昌善、宮戸祐治、山下隼人、阿保智、阿部真之、「原子間力顕微鏡法における薄膜破壊プロセスの解析(II)」、第66回応用物理学会春季学術講演会、東京工業大学大岡山キャンパス、2019年3月9日~12日
2. 山下隼人、勝部大樹、阿部真之、「TiO₂表面における脂質膜の光触媒分解過程の高速原子間力顕微鏡観察」、2018年日本表面真空学会学術講演会、神戸国際会議場、2018年11月20日
3. 山下隼人、勝部大樹、阿部真之、「光触媒 TiO₂ 表面における脂質膜分解過程の高速 AFM 観察」、第79回応用物理学会秋季学術講演会、名古屋国際会議場、2018年9月18日~21日
4. 石原浩行、若家富士男、村上勝久、長尾昌善、宮戸祐治、山下隼人、阿保智、阿部真之、「原子間力顕微鏡法における薄膜破壊プロセスの解析」、第79回応用物理学会秋季学術講演会、名古屋国際会議場、2018年9月18日~21日
5. K. Morigaki, Y. Tanimoto, H. Yamashita, A. Awazu, F. Hayashi, “Raftophilicity and aggregation of membrane proteins in the photo-transduction” 第56回日本生物物理学会年会、岡山大学津島キャンパス、2018年9月15日~17日

【ポスター発表】

1. 石原悟、笹川洋平、琴村直恵、山下隼人、阿部真之、二階堂愛、「ヌクレオソームの凝集度の違いでクロマチンを分画する」、第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2018年11月28日~30日
2. 荒木佑進、山下隼人、若家富士男、阿保智、宮戸祐治、阿部真之、「高速原子間力顕微鏡による膜タンパク質の動態観察のための擬似細胞環境の構築」、応用物理学会平成30年度第2回関西支部講演会、パナソニックワンダーラボ大阪、2018年10月26日
3. 山下隼人、田岡東、阿部真之、「バクテリア生細胞膜分子の高速 AFM イメージング」、第1回 ExCELLS シンポジウム、岡崎コンファレンスセンター、2018年10月15日~16日
4. 荒木佑進、大野雅恵、山下隼人、谷口雄一、阿部真之、「再構成クロマチンおよび酵母クロマチンの高速原子間力顕微鏡観察」、第91回日本生化学会大会、京都国際会館、2018年9月24日~26日
5. H. Yamashita, A. Taoka and M. Abe, “Molecular imaging of dynamic process on bacterial

cell surface by high speed AFM”, 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山大学津島キャンパス、2018 年 9 月 15 日~17 日

6. Y. Tanimoto, H. Yamashita, K. Nomura, M. Abe, F. Hayashi, K. Morigaki, “Observing the interaction between rhodopsin cluster and transducin by high-speed AFM”, 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山大学津島キャンパス、2018 年 9 月 15 日~17 日

[その他]

1. 在阪報道関係者との大阪大学の研究成果に関するポスターセッションにて発表
山下隼人、「生体分子の動く様子を直接観る顕微鏡」、大阪大学中之島センター、2019 年 3 月 8 日
2. 大阪大学豊中地区研究交流会にて発表
山下隼人、「生体分子の動く様子を可視化する高速原子間力顕微鏡」、大阪大学南部陽一郎ホール、2018 年 12 月 18 日
3. 投稿中の学術論文
H. Yamashita, Y. Abe, S. Aizu, J. Kato, K. Fujihara, M. Yasui and Y. Sohma, *Scientific reports*, under revision (2019)

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST 等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

（申請中の科研費）

1. 平成 31 年度 基盤研究 B 研究代表者
2. 平成 31 年度 新学術領域研究 研究分担者
3. 平成 31 年度 基盤研究 B 研究分担者
4. 平成 31 年度 挑戦的研究(萌芽) 研究分担者

参考となるHP等

<http://www.ae.stec.es.osaka-u.ac.jp/wp/>