

令和元年度 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 31 年 4 月～令和 2 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。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測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)。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。本年度は研究代表者・山下が微小穴デバイスの作製を進めると共に、共同研究者・川鍋が調製したチャネル膜タンパク質試料を山下の高速 AFM でイメージングを行った。また未来ラボの分野横断的研究を更に発展させるため、神戸大学バイオシグナル総合研究センターの森垣准教授らとシグナル受容体膜タンパク質の高速 AFM による共同研究も行った。以下に結果を示す。

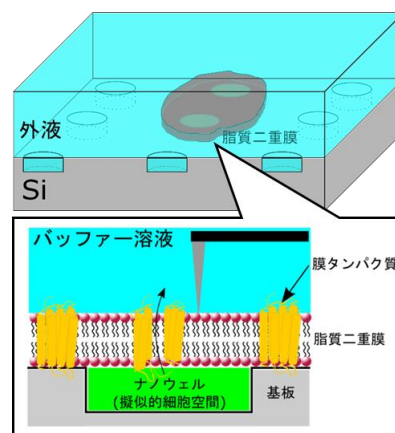


図 1: 研究概念図。細胞模倣環境下におけるタンパク質 1 分子イメージング

(研究結果)

【1】ナノ微小穴基板上の中空膜における膜タンパク質の高速 AFM 計測

前年度構築した細胞模倣環境の土台となるレジスト塗布した Si 基板上に電子線露光機で作製したナノ微小空間を用いて、生体膜でふさいだ中空膜上での膜タンパク質の高速 AFM 計測に取り組んだ。この計測では、ナノ微小穴上の中空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 AFM の空間分解能が低下したことから、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穴構造の条件を探索した。その結果、Si 基板上のレジストの膜厚を薄くすることで微小穴の深さ(体積)を小さくした所、膜の撓みを軽減させることが出来た(図 2)。

そこで、バクテリア細胞から精製した生体膜である紫膜を展開して、中空膜上での膜タンパク質分子の高速 AFM 観察を試みた(図 3)。紫膜中には細胞内外でプロトン(H⁺)輸送を行う膜タンパク質であるバクテリオロドプシン(bR)が分子集合して密に充填していることが知られている。前述で見出した微小穴構造(図 2D の条件)で中空膜上(図 3 左)を拡大して観察した結果、bR の集合構造(2次元結晶)を観察することに成功した(図 3 中央)。更に、これらを拡大した所、bR 分子が3量体を形成している様子を観察できていることが分かった(図 3 右)。これらの結果より、中空膜上において高速 AFM を用いて膜タンパク質分子を1分子レベルの高空間分解能で可視化できることを示せた。

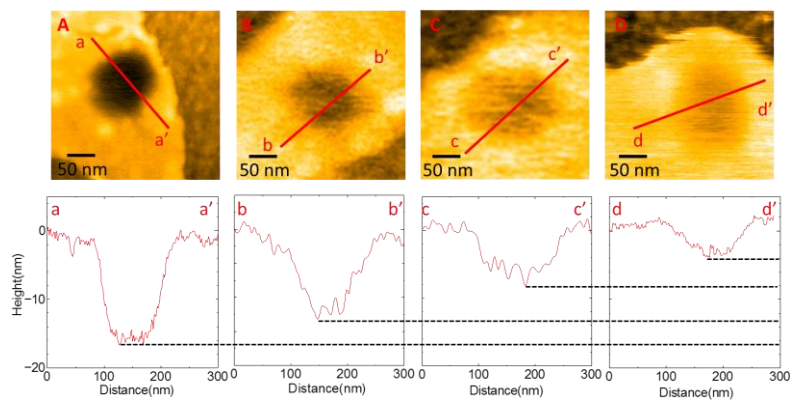


図 2: 中空膜上の高速 AFM 像(上段)と膜の断面図(下段)。体積の異なる穴構造(A:~9nm³、B:~5nm³、C:~4nm³、D:~3nm³)を作製し比較

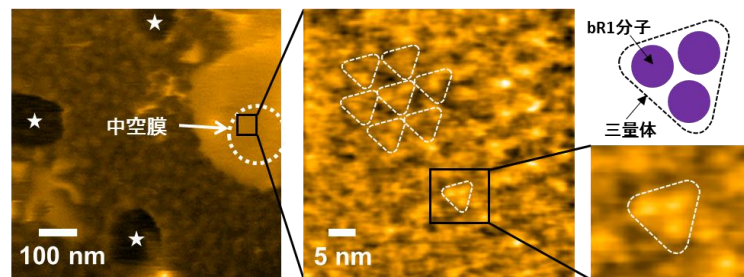


図 3: 中空膜上における bR 分子の高分解能像。左図☆印は穴構造、中央図・右図の点線三角は bR 分子の3量体を示す。

【2】高速 AFM による機能中の膜タンパク質の1分子動態観察

生体膜中で実際に機能している、医学的に重要な膜タンパク質の1分子動態イメージングを実現するため、共同研究者・川鍋と共に電位依存性チャネル VSOP の高速 AFM 観察に取り組んだ。川鍋が調製したサンプルを人工脂質膜へ再構成し、イメージングを行った所、VSOP と考えられる2量体構造を可視化することに成功した。今後、細胞内外のイオン環境を再現することで1分子動態観察に取り組んでいく。また、視細胞網膜に存在する光受容体膜タンパク質であるロドプシンの高速 AFM 研究を神戸大・森垣准教授・林名誉教授と行い、特徴的な2量体列構造の観察に成功した。本知見などをもとにロドプシン分子集合形成機構の分子動力学シミュレーション研究を広島大・栗津准教授と共に推進し、その結果を共著で論文発表を行った(雑誌論文 2)。

【3】本技術の更なる発展に向けた取り組み

微小穴を用いた中空膜上の高速 AFM イメージングで効率的にデータを出すには、微小穴デバイスを簡便かつ量産する必要がある。そこで大阪府立大学・遠藤准教授と高機能性材料を用いた新しい作製手法の共同研究を行った(特許出願準備中のため詳細を割愛)。また、本プローブ顕微鏡の高速化技術を更に向上させるため、スキャナーの技術開発を行い、論文発表を行った(雑誌論文 1)。また、当該高速 AFM 技術をもとに申請した JST 社会還元加速プログラム(SCORE)に採択され、高速 AFM を用いたバイオイメージング技術の社会実装に向けた取り組みも行った。

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（R1 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
825,000 円	102,370 円	2,630 円	0 円	60,000 円	990,000 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(現：香川大学医学部)

森垣憲一・神戸大学バイオシグナル総合研究センター

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

野村健人・大阪大学基礎工学研究科博士前期(修士)課程 2 年、

干鰯谷和彦・大阪大学基礎工学研究科博士前期(修士)課程 1 年、

発表論文等（令和 2 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

1. **H. Yamashita**, N. Handa, Y. Higashiura, and M. Abe, “Flexure structural scanner of tip scan type for high-speed scanning tunneling microscopy”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, accepted.
2. 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)
3. M. Hashimoto, S. Kitaoka, M. Furuya, H. Kanetaka, K. Hoshikaya, **H. Yamashita**, and M. Abe,
“Enhancement of cell differentiation on a surface potential-controlled nitrogen-doped TiO₂ surface”,
Journal of the Ceramic Society of Japan, Vol.127, 636-641 (2019)
4. S. Ojima, D. Katsube, **H. Yamashita**, Y. Miyato, S. Abo, and M. Abe, “Surface structure switching between (1 × 1) and (1 × 2) of rutile TiO₂(110) with scanning tunneling microscopy and low energy electron diffraction”, *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.58, SIIA10 (2019)
5. **A. Kawanabe**, N. Mizutani, O. K Polat, T. Yonezawa, T. Kawai, M. X Mori, Y. Okamura, “Engineering an enhanced voltage-sensing phosphatase”, *The Journal of general physiology* 152(5) (2020)
6. N. Takagaki, A. Ohta, K. Ohnishi, **A. Kawanabe**, Y. Minakuchi, A. Toyoda, Y. Fujiwara, A. Kuhara,
“The mechanoreceptor DEG-1 regulates cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*”, *EMBO reports* e48671 (2020)

〔著書〕

1. **山下隼人**、「高速原子間力顕微鏡によるバクテリア細胞表面の高解像イメージング」、顕微鏡、Vol.54, No.2 (2019): 査読有、Cover art 掲載

〔学会発表〕

【招待講演】

1. 山下隼人、「高速 AFM による細菌生細胞膜分子の高解像動態イメージング」、日本顕微鏡学会第 62 回シンポジウム、2019 年 11 月 29 日

【国際学会】

2. H. Yamashita, N. Handa, Y. Higashiura, M. Abe, "Instrumental development of the scanner for high-speed scanning tunneling microscopy", 12th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '19, October 20~25, 2019

【国内学会】

(口頭発表)

3. DiaoZhuo、勝部大樹、山下隼人、阿部真之、「ベイズ推定を用いた NC-AFM の短距離力の抽出および異なる探針のフォースカーブの比較」、応用物理学会春季学術講演会、2020 年 3 月 14 日
4. Diao Zhuo、勝部大樹、山下隼人、杉本宜昭、阿部真之、機械学習を用いたフォースマッピングの自動解析、第 80 回応用物理学会秋季学術講演会、9 月 18 日~21 日
5. 山下隼人、勝部大樹、阿部真之、「高速 AFM による光触媒 TiO₂ 表面における脂質膜分解過程のリアルタイム観察」、日本金属学会 2019 年秋期大会、9 月 11 日
6. 野村健人、山下隼人、久富修、阿部真之、「高速原子間力顕微鏡による DNA 結合光受容タンパク質 Photozipper の 1 分子動態観察」、第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、6 月 24 日~26 日
7. 野村健人、山下隼人、久富修、阿部真之、「高速 AFM による DNA 結合光受容タンパク質 Photozipper の 1 分子動態イメージング」、第 66 回日本生化学会近畿支部例会、5 月 25 日
8. 山下隼人、田岡東、阿部真之、「高速 AFM による細菌細胞表面の分子動態イメージング」、第 92 回日本細菌学会、選抜ワークショップ、4 月 23 日~25 日

(ポスター発表)

9. 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ョン動態過程の高速 AFM 観察」、生体エネルギー研究会第 45 回討論会、2019 年 12 月 21 日
10. 辻明宏、山下隼人、阿部真之、「高速原子間力顕微鏡による細胞死過程観察に向けた 1 細胞計測基盤の構築」、応用物理学会関西支部 2019 年度第 2 回講演会、2019 年 11 月 8 日
11. 松井爽斗、山下隼人、阿部真之、「ステージ走査型高速 AFM・高解像蛍光顕微鏡複合装置の開発」、応用物理学会関西支部 2019 年度第 2 回講演会、2019 年 11 月 8 日
12. 野村健人、山下隼人、久富修、阿部真之、「DNA 結合光受容タンパク質 Photozipper の高速 AFM による 1 分子動態イメージング」、研究会「理論と実験」2019、10 月 10~11 日

13. 干鯛谷和彦、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、10 月 10～11 日
14. K. Nomura, H. Yamashita, O. Hisatomi, M. Abe, "Single molecular dynamics imaging of DNA binding photoreceptor protein, Photozipper, by high-speed AFM", 第 57 回生物物理学会年会, 9 月 24 日～26 日
15. 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, 9 月 24 日～26 日
16. 山下隼人、田岡東、阿部真之、「高速 AFM による細菌細胞表面の分子イメージング」、第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、6 月 24 日～26 日
17. 干鯛谷和彦、橋本雅美、山下隼人、阿部真之、「酸化チタン表面に吸着したタンパク質凝集構造の原子間力顕微鏡による観察」、応用物理学会関西支部 2019 年度第 1 回講演会、6 月 20 日

〔その他〕

1. 新聞記事掲載

中国新聞、2020 年 2 月 29 日 (24 面)、「網膜中で光感知するタンパク質ロドプシンの構造解明」

2. 特許出願

山下隼人、阿部真之、折口直紀、「走査型プローブ顕微鏡及び走査型プローブ顕微鏡の駆動制御装置」、特願 2019-162391、2019 年 9 月 5 日、

3. 大阪大学豊中地区研究交流会にて発表

山下隼人、「タンパク質 1 分子の動態を可視化する高速原子間力顕微鏡」、大阪大学シグマホール、2019 年 12 月 17 日

4. 社会実装を目指す研究シーズ集 2020 Research profiles 大阪大学共創機構

山下隼人、「生細胞膜分子を可視化する高速原子間力顕微鏡」

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）

（獲得済）

1. 2019 年度 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課題 研究代表者
2. 平成 31 年度 新学術領域研究（研究領域提案型） 研究分担者
3. JST 社会還元加速プログラム(SCORE) 研究分担者

（申請中）

1. 令和 2 年度 基盤研究 B 研究代表者
2. 令和 2 年度 挑戦的研究(萌芽) 研究代表者

参考となるHP等

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

<https://researchmap.jp/10595440>