令和２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～令和 2 年 9 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

　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。

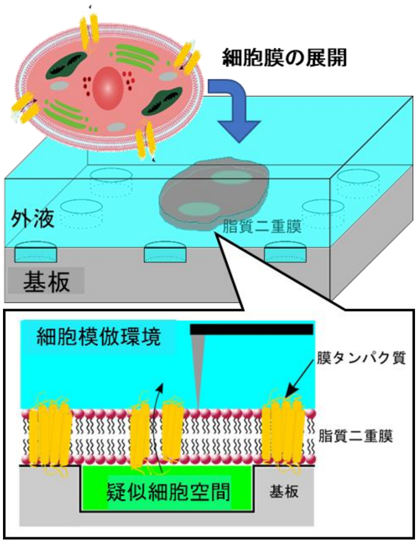

図 1. 高速 AFM による機能中の膜タンパク質１分子動態観察の概念図

　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(図 1)。これにより、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した。本研究を実施するに当たって、共同研究者として医学研究科の川鍋博士と共に、医学的に重要な膜タンパク質をターゲットとして研究を推進した。また、当該未来研究ラボシステム（共同研究）の目的である、「学際的研究組織への発展」および「新しい共同研究の創出」を目指すため、研究期間を通じて他分野の研究者と高速 AFM 技術を駆使した新たな共同研究を積極的に推進した。これらを含めた研究期間全体の主な成果を以下に述べる。

【1】高速 AFM による膜タンパク質の１分子構造動態観察

　本研究では、高速 AFM で機能中の膜タンパク質１分子動態観察を行うため生きた細胞にできるだけ近い「①細胞模倣環境構築」と「②Native(細胞機能)に近い生体試料調整」の両面から課題に取り組んだ。まず AFM 基板上で細胞模倣環境を実現するため、微細加工技術を用いて基板上にナノサイズの微小穴を作製し、生体膜でふさぐことで疑似細胞空間を構築した。中空膜中の膜タンパク質を AFM で観察する際に膜が撓むことにより空間分解能が低下したため、高分解能で観察可能な微小穴の条件検討を行い、穴の深さ(体積)を小さくすることで膜の撓みが軽減することが分かった。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、AFM 観察した

結果、バクテリオロドプシン３量体を１分子レベルの高空間分解能で観察することに成功した。しかし前述の方法ではレジスト塗布した Si 基板上に電子線露光機で１つ１つ微小穴を作製するため量産が難しく、また高速駆動を行う高速AFMの微小ステージへの取付けも容易ではない上、走査性能の低下も招く。安定かつ効率的に高速 AFM 測定を行うには微小穴基板を簡便かつ量産する必要があった。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開発に取り組み、従来の高速 AFM 計測で用いているガラス基板上に簡便かつ大量に微小穴を作製する手法の構築に成功した（未発表：論文準備中のため詳細を割愛）。現在、穴サイズの調整中のため研究期間内にこの基板を用いたターゲット膜タンパク質のイメージングにまで達しなかったが、今後、本手法を用いることで機能中の膜タンパク質 1 分子動態研究が大きく進展することが期待でき、未来研究ラボシステムにおいて、その技術基盤の構築を行うことができた。

一方で上記と並行して共同研究者の川鍋博士のもとで、電位依存性プロトンチャネル VSOP の AFM 観察のための高純度試料調製を行った。VSOP は転移性乳がんで高発現が確認されており、また虚血性脳障害の増悪に関与していることも報告されている、医学的に重要なターゲット膜タンパク質の１つである。興味深いことに VSOP は単量体で機能完結しているにも関わらず、２量体を形成し、協調してチャネルの開閉を制御していることが川鍋の所属する研究グループで提案されている (Fujiwara, (2012) *Nat. Commun.*)。本研究で構築してきた１分子観察環境を用いて、高速 AFM で VSOP の構造観察を行ったところ、精製した VSOP の可溶化状態では、フットボール様の構造をした分子が観察され、それらにはペアを形成するものも見られたことから 2 量体を形成していることが示された（図 2）。一方で脂質膜へ再構成したところ、単量体と考えられる球状構造体と共に 2 量体以上の多量体を形成していることを示唆する分子が観察された。蛍光顕微鏡による Native 細胞内での局在観察では、VSOP が細胞膜に一様に発現しているわけではなく、かなり偏った発現パターンを示すことも分かってきており、これまで考えられていた以上に集積化している可能性が示された。これらの結果は、分子生物学会において共同研究者である川鍋博士と共著で発表した（学会発表 8）。また本研究成果は現在論文準備中である。本研究の更なる発展を目指して共同研究者である川鍋氏は山下を共同研究者として上原記念生命科学財団の研究奨励金へ応募し、採択された（**獲得済外部資金 3**）。

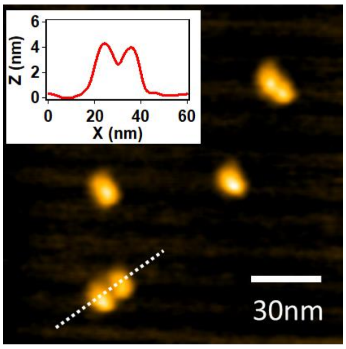

図 2: VSOP1 分子の高速 AFM 像。挿入グラフは AFM 像中の点線部の断面図を示す。

【2】生体分子ナノ動態解析に関する分野横断的研究の推進

本研究の高速 AFM 技術を駆使した新しい共同研究を創出するため、研究期間内に様々な分野の研究者と本研究に関連する共同研究を推進した。視細胞の光受容膜タンパク質であるロドプシン（Rh）の研究では神戸大学の森垣准教授・林名誉教授とともにカエルから調製した Rh の高速 AFM 観察を行い、特徴的な 2 量体列構造を可視化することに成功した（学会発表 10）。この成果をもとに、視細胞における光信号伝達過程である Rh と G タンパク質（Gt）の相互作用メカニズム解明を目指して、山下を代表として大阪大・神戸大・広島大でチームを結成し、科研費・基盤研

究 B へ応募した結果、令和 2 年度に新たに採択された(<u>**獲得済外部資金 1**</u>)。学際的研究チームを組織して現在、当該研究を推進している。

人工核酸の合成研究では名古屋大学の樫田准教授が開発した Serinol nucleic acid(SNA)ナノワイヤーを高速 AFM で観察し(図 3)、その構造や長さの定量解析を行った結果を Chemical science 誌にて発表した(<u>**業績：雑誌論文 1**</u>)。更に、細胞内センサーとして現在注目されているナノダイヤの研究では、大阪大学蛋白質研究所の鈴木講師と共に細胞がナノダイヤを取込む過程の AFM 計測に取り組んでおり(<u>**学会発表 4**</u>)、関連する研究結果を Science Advances 誌にて発表した(<u>**業績：雑誌論文 2**</u>)。また未来研究ラボシステムを通じて知り合った、同じく未来研究ラボ長である基礎工学研究科物質創成専攻の山元准教授と光受容体タンパク質 Cryptochrome の高速 AFM を用いた 1 分子構造観察を行った。プレリミナリーではあるが幾つかデータが出ており、今後も継続して共同研究を行っていく予定である。

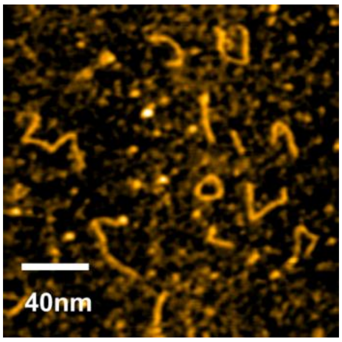

図 3:人工核酸 SNA の高速 AFM 観察(**業績：雑誌論文 1**)

このように生物・化学分野の研究者との共同研究により大きな成果が得られ、新しい共同研究の創出に繋がった。未来研究ラボシステムで得られた成果とそこで培った技術・人脈をもとに、今後は更なる大型の学際研究組織へと展開していきたい。

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（R2 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	535,000 円	0 円	0 円	27,000 円	562,000 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：香川大学医学研究科)

森垣憲一・神戸大学バイオシグナル総合研究センター、林文夫・神戸大学理学部

樫田啓・名古屋大学大学院工学研究科

鈴木団・大阪大学蛋白質研究所

(2)研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合))

千鰯谷和彦・大阪大学大学院基礎工学研究科博士前期(修士)課程 2 年

松井爽斗・大阪大学大学院基礎工学研究科博士前期(修士)課程 1 年

辻明宏・大阪大学大学院基礎工学研究科博士前期(修士)課程 1 年

発表論文等（令和 3 年 3 月 31 日現在）

［雑誌論文］

1. **H. Kashida**, K. Nishikawa, W. Shi, T. Miyagawa, **H. Yamashita**, M. Abe, H. Asanuma
“A helical amplification system composed of artificial nucleic acids”, ***Chemical science*** 12(5) (2021)
2. S. Sotoma, C. Zhong, J. C. Yong Kah, **H. Yamashita**, T. Plakhotnik, Y. Harada, **M. Suzuki**
“In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors”, ***Science Advances*** 7(3) (2021)
3. Z. Diao, D. Katsube, **H. Yamashita**, Y. Sugimoto, O. Custance, M. Abe
“Automated extraction of the short-range part of the interaction in non-contact atomic force microscopy”, ***Applied Physics Letters***, 117(3) (2020)
4. **H. Yamashita**, N. Handa, Y. Higashiura, M. Abe
“Flexure Structural Scanner of Tip Scan Type for High-speed Scanning Tunneling Microscopy”, ***e-Journal of Surface Science and Nanotechnology***, 18, 146-151, (2020)

［学会発表］

（口頭発表）

1. 山下隼人、阿部真之、「高速 AFM による生きた細菌細胞の高解像分子動態イメージング」
第 73 回日本細菌学会関西支部総会、2020 年 11 月 14 日、5-S
2. 阿部真之、勝部大樹、山下隼人、稲見栄一、「金属酸化物表面の走査型トンネル顕微鏡/非接触原子間力顕微鏡測定」、日本金属学会 2020 年秋期第 167 回講演会、2020 年 9 月 18 日、S2-23
3. Fengxuan Li、Daiki Katsube、Eiichi Inami、**Hayato Yamashida**、Masayuki Abe, "In-situ scanning tunneling microscopy observation of water adsorption on rutile TiO2(110)-(1×2) surface", 第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、2020 年 9 月 11 日、11a-Z06-10
4. 松井爽斗、仲崇霞、山下隼人、鈴木団、阿部真之、「蛍光顕微鏡・高速 AFM 複合装置による生細胞のナノ粒子取り込み過程の計測」、第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、2020 年 9 月 10 日、10p-Z12-8
5. Diao Zhuo、勝部大樹、山下隼人、阿部真之、「モンテカルロ法による NC-AFM のフォースカーブの解析」、第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、2020 年 9 月 10 日、10p-Z06-18
6. 山下隼人、阿部真之、「材料科学のための高速走査型トンネル顕微鏡の開発」、日本セラミックス協会 第 33 回秋季シンポジウム、2020 年 9 月 3 日、2C07
7. Fengxuan Li、阿部真之、山下隼人、勝部大樹、稲見栄一、「非接触原子間力顕微鏡/走査型トンネル顕微鏡を用いた TiO2(110)-(1×2)表面における水吸着測定」、日本セラミックス協会 第 33 回秋季シンポジウム、2020 年 9 月 3 日、2C08

（ポスター発表）

8. 山下隼人、川鍋陽、阿部真之、「高速原子間力顕微鏡による電位依存性プロトンチャネルの 1 分子構造観察」、第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 4 日、3P-0013
9. 辻明宏、山下隼人、野村健人、久冨修、阿部真之、「高速 AFM による光応答転写因子 Photozipper

のナノスケール観察」、第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 4 日、3P-0085

10. 千鰯谷和彦、山下隼人、林文夫、森垣憲一、藤井雅史、栗津暁紀、阿部真之、「高速 AFM によるロドプシンクラスター上トランスデューシン動的過程の観察」、第 58 回日本生物物理学会年会、2020 年 9 月 16 日、20376M
11. 辻明宏、野村健人、山下隼人、久富修、阿部真之、「光応答転写因子 Photozipper における二量体形成過程の高速 AFM 観察」、第 58 回日本生物物理学会年会、2020 年 9 月 16 日、20386M

［その他］

1. プレスリリース：生物物理学会ニュース 2021 年 1 月 22 日「ナノ量子センサーを新開発し、細胞内の熱伝導率を初計測」、https://www.biophys.jp/news/lib/newsshow.php/4912
2. 特許取得
   (1) 日本国特許第 6846056 号、「スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡」、山下隼人、阿部真之、2021 年３月３日
   (2) 米国特許第 10,884,022 号、「スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡」、山下隼人、阿部真之、2021 年１月５日

外部資金獲得状況・申請状況

（獲得済）

1. 科研費基盤研究 B (研究代表者)：令和 2 年度~令和 4 年度
   「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」
2. 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）令和 2 年度
3. 上原記念生命科学財団(2019-2020) (共同研究者)

（申請中）

1. 令和 3 年度　科研費　学術変革領域研究 B　（研究分担者）
2. 令和 3 年度　 JST 研究成果展開事業 A-STEP　（研究分担者）

参考となるＨＰ等

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

https://researchmap.jp/10595440