

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14489

研究課題名(和文) ナノ空間に閉じ込めた人工膜の開発

研究課題名(英文) Model biological membrane having a nanometric gap structure

研究代表者

森垣 憲一 (Morigaki, Kenichi)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：10358179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の機能を1分子で定量的に評価することは、重要かつ困難な課題である。本研究は、膜タンパク質機能を計測する新しい方法論を創出することを目的として、ガラス基板と高分子エラストマー(ポリジメチルシロキサン：PDMS)にはさまれた厚さ10～100 nmのナノ空間にパターン化人工膜を形成し、膜タンパク質を超高感度(1分子)で解析する技術を開発した。接着層として、高分子ブラシ被覆シリカ微粒子を用いることで、厚さを厳密に制御し、非特異的吸着を抑制したナノ空間を実現した。モデルタンパク質として、ウシガエル視細胞由来のロドプシンを導入し、ナノ空間内部で1分子蛍光観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a model biological membrane having a nanometric gap structure (nanogap-junction) as a platform for the single molecule observation of membrane proteins. The model biological membrane was composed of polymeric and fluid lipid bilayers. The polymeric lipid bilayer was attached with a silicone elastomer (PDMS) sheet using polymer-brush-coated silica nanoparticles as the adhesion layer, creating a nanometric gap junction between the fluid bilayer and PDMS. Silica nanoparticles proved to be an excellent material for the adhesion layer due to the mono-disperse size and mechanical stability. Thickness of the nanogap-junction was controlled by the size of silica nanoparticles. Nanogap-junction enabled to observe reconstituted membrane proteins with a heightened signal-to-noise (S/N) ratio. The nanogap-junction provides new opportunities for the single molecule biophysics of membrane proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：膜タンパク質 人工膜 ナノ空間 1分子計測

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は、多様な脂質と膜タンパク質からなる精密な超分子システムであり、局所的な分子集合状態(例:脂質ラフト)が細胞機能に大きな影響を与えることが分かってきた(Lingwood Science 327: 46 (2010))。しかし、膜タンパク質の機能を分子レベルで定量的に理解することは困難な課題である。

研究代表者は、光重合したポリマー脂質膜と生体由来の脂質膜(流動性脂質膜)をガラス基板に吸着させたパターン化人工膜をオンリーワン技術として確立した(Langmuir 25: 345 (2009))。そして、ポリマー脂質膜と高分子エラストマー(PDMS)を接着して形成した微小空間において生体分子機能を高感度に計測する手法を開発した(特願2009-201187, Anal. Chem. 84: 155 (2012), Langmuir 29: 2722 (2013), 特許5532229号)。近年では、ポリマー脂質膜の表面に高密度の親水性高分子鎖(高分子ブラシ)を形成する技術を開発し、人工膜とガラス基板との距離を制御することが可能になった。

### 2. 研究の目的

本研究は、高分子ブラシを接着層としてパターン化人工膜とPDMSとを接合し、厚さが10~100 nmで制御されたナノ空間(ナノギャップ構造)を作製する技術を開発し、ナノ空間に閉じ込められた人工膜において膜タンパク質機能を超高感度(1分子)で解析する技術を開発することを目的とした(図1)。そのため、親水性高分子ブラシ材料を用いたナノギャップ構造作製技術を開発し、モデル膜タンパク質としてロドプシン光受容体をナノギャップ構造にて1分子蛍光観察した。

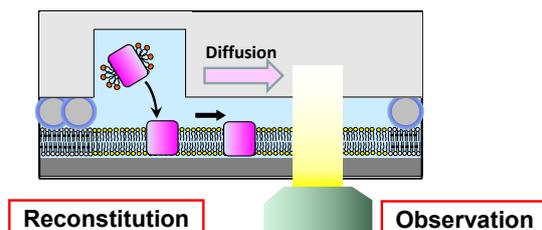


図1: ナノギャップ構造を用いた膜タンパク質の1分子蛍光観察(概念図)

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノギャップ構造の作製

ナノギャップ構造は以下の3工程で作製した。  
①光リソグラフィー技術を用いて、ポリマー脂質膜と流動性脂質膜からなるパターン化人工膜をガラス基板表面に作製した。ポリマー脂質膜は、光重合性リン脂質(DiynePC, DiynePE: 図2)二分子膜をガラス基板に累積し、紫外光照射で重合した。モノマーを除去した部位には天然脂質ベシクルを用いて流動性脂質膜を形成した(ベシクル融合法)。

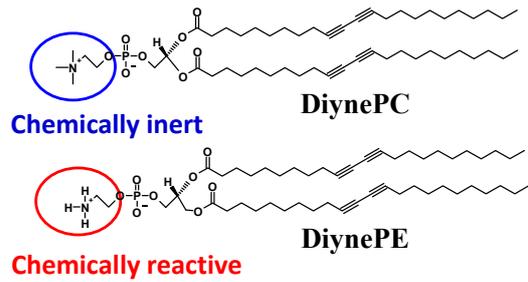


図2: 光重合性リン脂質(DiynePC, DiynePE)

②親水性高分子材料を用いた接着層を開発するため、以下の2種類の材料を検討した。(a)ポリマー脂質膜の表面に、原子移動ラジカル重合(ATRP)を利用した表面開始ラジカル重合法により、鎖長が均一で高密度な高分子ブラシを作製した(DiynePEが重合開始点となる)。高分子材料としては、親水性で生体適合性が高い2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC)を用い、重合時間により鎖長を制御した(図3)。(b)シリカ微粒子表面にMPCを用いて親水性高分子ブラシを形成した。シリカ微粒子は、粒径100nmのものを用い、ATRP反応条件でブラシ鎖長を調節した。

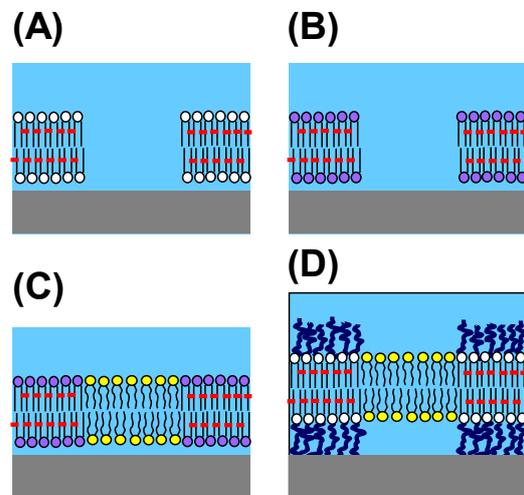


図3: ポリマー脂質膜表面から親水性高分子ブラシを形成する(概念図)。

③高分子ブラシとPDMS表面との結合は、ビオチン基・ストレプトアビジンの特異的相互作用を利用した。そのため、PDMSに牛血清アルブミンを吸着させ、その表面をビオチン化した。接着層とPDMSの間は水溶液が満たされているが、水溶液を少しずつ除くことにより距離が近づき、最終的に高分子ブラシとPDMSが接合した。パターン化人工膜の流動性脂質膜部位には高分子鎖がないため、膜とPDMSの間に厚さ100 nm程度の空隙(ナノギャップ構造)ができた。

## (2) ナノギャップ構造の評価

ナノギャップ構造の形成は、2種類のモデルタンパク質(コレラ毒素サブユニットB(CTB)とウシ血清アルブミン(BSA))の中から、流動性膜に結合できるCTBがナノギャップ構造に選択的に移行することを元に評価した。ナノギャップ構造の厚さは、ギャップ内における水溶性蛍光色素の蛍光強度を測定したことで評価した。より小さなギャップ構造(50nm以下)は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)も活用した。また、ナノギャップ構造内に閉じ込められた流動性脂質膜の構造(連続性)と物性(流動性)は、蛍光褪色回復(FRAP)法により評価した。

## (3) 膜タンパク質導入

ナノギャップ構造に導入されるモデル膜タンパク質として、ロドプシン光受容体(Rh)を用いた。Rhは構造・機能解析が最も進んだGタンパク質共役型受容体(GPCR)であり光刺激で活性化してGタンパク質(トランスデュシン(Gt))に結合する。RhおよびGtはウシガエル視細胞由来のものを精製して用いる(連携研究者より供給)。PDMSにサンプル導入孔(Inlet)を設けて、界面活性剤(オクタリルグルコシド)に可溶化したRhを添加することで、Rhを流動性脂質膜に再構成した。そして、Rh分子の膜内側方拡散によりナノギャップ構造へ導入した。

## 4. 研究成果

### (1) 高分子ブラシ:

ポリマー脂質膜の表面に、ATRP利用した表面開始ラジカル重合法により、鎖長が均一で高密度な高分子ブラシを作製した。親水性で生体適合性が高いMPCを高分子材料として用い、重合時間により鎖長を制御することに成功した。また、水溶液中でATRP反応を行うことにより、流動性脂質膜と共存するポリマー脂質膜に高分子ブラシを形成した。シリコン基板と脂質膜との蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いることで、基板・膜間の距離を評価した。高分子ブラシ形成前は基板へのFRETによりポリマー膜の蛍光は観察されなかったが、高分子ブラシ形成後には蛍光が観察され、高分子ブラシによって膜・基板間の距離が増大したことが示唆された(図4)。また、ポリマー膜に組み込まれた流動性脂質膜は、高分子ブラシ形成後も流動性を保っていた。以上の結果は、Langmuir誌に掲載された(Nishimura, Langmuir 33, 5752 (2017))、国内外での学会でも発表した。

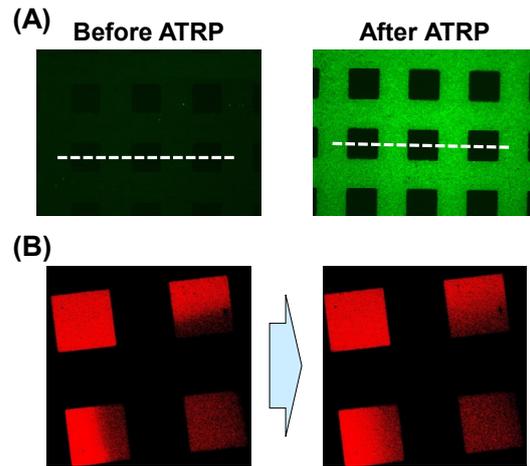


図4: (A) 高分子ブラシ形成にともなう蛍光強度増大(FRET解消)から、パターン化膜と基板との距離が増大したことが示唆された。

(B) ポリマー膜に組み込まれた流動性脂質膜の側方拡散は蛍光褪色後回復(FRAP)法により確認された。

### (2) ナノギャップ構造:

ナノギャップ構造の作製は、接着層としてシリカ微粒子を用いた接合を行った。これまでの検討では接着層に脂質ベシクルを用いてきたが、シリカ微粒子を接着層に用いることで、ナノギャップ構造の厚さをより厳密に制御することができた。モデル分子としてコレラ毒素サブユニットB(CTB)とウシ血清アルブミン(BSA)を用いた導入実験では、流動性膜に結合できるCTBがナノギャップ構造に選択的に移行し、シグナル・ノイズ比(S/N比)が大幅に向上した。そして、より小さなシリカ微粒子を接着層に用いたナノギャップ構造においてS/N比がより高くなることが示された(図5)。

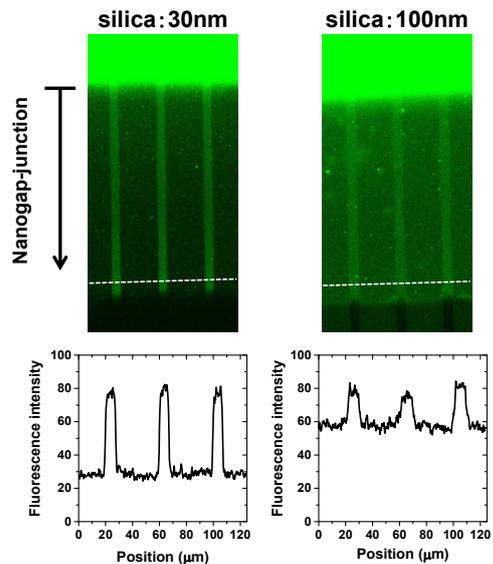


図5: ナノギャップ構造への選択的分子導入。CTBとBSAの混合液のうち、CTBのみが選択

的にナノギャップ構造に導入された。接着層に用いられるシリカ微粒子サイズが小さい方が選択性が高まった。

さらに、シリカ微粒子が極めて機械的安定性の高い材料であるため、ナノギャップ構造の安定性が大幅に改善した。一旦形成したナノギャップ構造は、低温下で長期保存が可能であった（1週間以上）。また、シリカ微粒子の表面修飾方法としては、脂質二分子膜と高分子ブラシを被覆する方法とを比較した。MPCからなる高分子ブラシを用いることで脂溶性分子の非特異的吸着が抑制され、特定分子をギャップ内でより高感度に検出することが可能になった。以上の結果については現在、論文執筆中である。

### (3) 膜タンパク質導入：

モデルタンパク質として、ウシガエル視細胞由来のロドプシンおよびトランスデュシンを用いて、ナノ空間内部で膜タンパク質を1分子蛍光観察することに成功した。脂質膜に再構成されたロドプシン分子のみが選択的にギャップ構造に拡散し、一分子ずつ蛍光観察することができた（図6）。また、接着層に高分子ブラシ被覆シリカ微粒子を用いることで、ロドプシン分子の接着層への非特異的吸着が抑制され背景蛍光が低下することで、ギャップ内のロドプシン分子をより高感度に検出することが可能になった。以上の結果については現在、論文執筆中である。

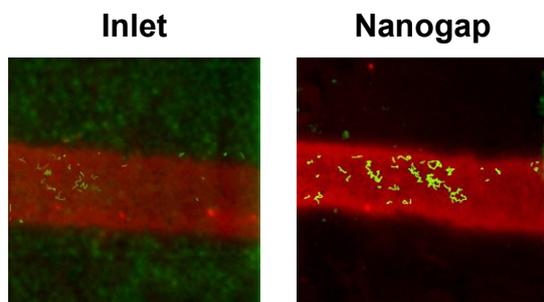


図6：ナノギャップ構造への膜タンパク質導入。再構成されたロドプシン分子は、導入孔（Inlet）よりもナノギャップ構造においてより高いシグナル・ノイズ比で1分子蛍光観察することができた。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計7件）

- 1) Ando, K., Tanabe, M., \*Morigaki, K. "Nanometric gap structure with fluid lipid bilayer for the selective transport and detection of biological molecules",

*Langmuir* **32** (31), 7958-7964 (2016)

- 2) Nomura, K., Tanimoto, Y., Hayashi, F., Harada, E., Shan, X.-Y., Shionyu, M., Hijikata, A., Shirai, T., Morigaki, K., Shimamoto, K. "The role of the Prod1 membrane anchor in newt limb regeneration", *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (1), 270-274, (2017)
- 3) Nishimura, T., Tamura, F., Kobayashi, S., Tanimoto, Y., Hayashi, F., Sudo, Y., Iwasaki, Y., \*Morigaki, K. "Hybrid model membrane combining micropatterned lipid bilayer and hydrophilic polymer brush", *Langmuir* **33** (23), 5752-5759, (2017)

〔学会発表〕（計14件）

- 1) Morigaki, K., Tanimoto, Y., Hayashi, F. "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", 251st American Chemical Society National Meeting, 2016年3月13-17日, San Diego, USA
- 2) Morigaki, K., Nishimura, T., Tamura, F., Kobayashi, S., Tanimoto, Y., Sudo, Y., Hayashi, F., Iwasaki, K. "Hybrid model membrane combining micropatterned lipid bilayer and hydrophilic polymer brush", 253rd American Chemical Society National Meeting, 2017年4月2-6日, San Francisco, USA
- 3) Morigaki, K. "Model membrane on a solid substrate: Crawling to grow from 2D into 3D structures", BioNano summer school 2017, 2017年8月13-19日, Hirscheegg, Austria

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-n  
owstone/index.html](http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-n<br/>owstone/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森垣 憲一 (Morigaki Kenichi)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：10358179

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

林 文夫 (Hayashi Fumio)

神戸大学・大学院理学系研究科・名誉教授

研究者番号：80093524

### (4) 研究協力者

該当なし