

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600052

研究課題名(和文) 高速AFMによる膜タンパク質の機能動態観察のための中空平面膜基板の開発

研究課題名(英文) Development of Non-Supported Membrane over Nanowells for Visualization of Functional Dynamics of Membrane Proteins with High-Speed AFM

研究代表者

内橋 貴之 (UCHIHASHI, TAKAYUKI)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号：30326300

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)：電子線リソグラフィーと収束イオンビーム(FIB)を用いて固体基板に直径100nmのナノ開口アレイを製作し、ナノ開口を脂質二重膜で封止することができた。また、紫膜でナノ開口を封止することで、中空膜でバクテリオロドプシン2次元結晶を高速AFMで高解像観察することに成功した。さらに、直径100nmのガラスあるいはポリスチレンビーズを鋳型としてシリコンゴム(PDMS)に多数のナノ開口を簡便に製作することにも成功した。基板支持膜に再構成されたイオンチャネルKcsAの四量体と拡散ダイナミクスを高速AFM観察することにも成功した。今後、KcsAを中空膜に再構成し機能動態の高速AFM観察を行っていく。

研究成果の概要(英文)：We prepared nano-pore arrays with a diameter of 100nm on glass and silicon substrate using electron-beam lithography and focused ion beam. Also we succeeded in sealing the nano pores with lipid bilayers. Purple membranes in which two dimensional crystals of bacteriorhodopsin are embedded were used as a test sample and the individual bacteriorhodopsin molecules were resolved on the nano pore with high-speed AFM. We also developed a method to conveniently prepare the nano pores on a silicone elastomer using small beads with a diameter of 100nm as a template. We observed ion-channel membrane protein KcsA on a supported lipid bilayer and visualized individual KcsA tetramers and their diffusion dynamics in the membrane. As the next step, we will reconstitute KcsA molecules into the membrane on the nano pore and reveal structural dynamics of KcsA..

研究分野：生物物理学

キーワード：一分子計測 膜タンパク質 高速原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高速原子間力顕微鏡(AFM)は生理環境下にあるタンパク質の機能動態を可視化できる唯一の装置であり、これまでモータータンパク質などの可溶性試料において機能動態の可視化に威力を発揮してきた。高速AFMの重要な応用ターゲットの一つとして膜タンパク質が挙げられる。膜タンパク質は全タンパク質の1/3を占め、細胞内外のシグナル伝達や分子の輸送など生命活動維持に必須な多くの機能を担っており、膜タンパク質の機能発現のメカニズムを明らかにすることは生命科学の中心的課題の一つである。従来、膜タンパク質のAFM観察の多くは固体基板に展開した支持膜中に再構成された分子で行われてきたが、固体支持膜ではATP合成酵素やイオンチャネルなど、その機能に膜内外のイオン濃度勾配や電位差が必要な膜タンパク質の機能動態を観察することはできない。一方、中空平面膜では、分子は高速に側方および回転拡散するため、AFM観察を行うことは不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高速AFMによる膜タンパク質の機能動態観察のための、膜の両側でイオン濃度勾配を作ることができ、かつ分子の拡散を抑制できる中空平面膜基板の開発を行うことである。

3. 研究の方法

最初にガラスまたはシリコン基板に電子線リソグラフィーあるいは収束イオンビーム(FIB)により微細加工を施し、直径100nm以下のナノ開口をアレイ状に製作する基盤技術の確立を目指した。電子線リソグラフィーによるナノ開口の製作は共同研究者により実施し、FIBによる加工は代表者の研究室に設置された装置で行った。これら二つの方法により製作されたナノ開口上に脂質二重膜を再現性良く展開する方法について検討した。脂質二重膜によるナノ開口の封止状態は蛍光色素で標識した脂質二重膜を蛍光顕微鏡あるいはAFMによる表面構造の観察で確認した。また、ナノ開口中に封入した蛍光色素の拡散を蛍光顕微鏡で観察することで、脂質二重膜によるナノ開口の封止状態を評価した。また、より簡便なナノ開口の作成を目指して、ポリスチレンビーズを鋳型としたシリコンゴム基板へのナノ開口の作製も検討した。作製されたナノ開口に紫膜を展開し、ナノ開口上中空膜でバクテリオロドプシン2次元結晶の高速AFM観察を行い、空間分解能の評価を行った。

また、上記基板作製と並行して固体基板支持膜中に再構成されたイオンチャネル膜タンパク質KcsAの高速AFM観察を行い、

イオンチャネルの機能動態観察に向けた測定条件の検討を行った。

4. 研究成果

電子線リソグラフィーによりガラス基板に作製したナノ開口アレイについては、蛍光顕微鏡で脂質膜がナノ開口を封止していることが確認できた。また、FIBによるシリコン基板の加工で、直径100nm、深さ20nmのナノ開口アレイを安定に製作することができた。この基板上で紫膜を含んだ溶液をインキュベーションして高速AFM観察を行ったところ、中空膜中でバクテリオロドプシン2次元結晶の格子像を観察することができた。しかしながら、これらの方法ではナノ開口アレイの製作に数十時間の時間を要し、かつアレイが形成される領域が数 μm 四方に限定されるため、高速AFMで観察領域に探針をアプローチするのに非常に時間が掛かることが問題となった。これを解決するために、直径100nmのポリスチレンビーズを鋳型としてシリコンゴムにナノ開口を多数製作する方法を検討し、短時間でナノ開口を基板上に多数形成することに成功した。この基板でも紫膜を展開し、バクテリオロドプシン2次元結晶を高速AFM観察することができた。

膜タンパク質のテスト試料として K^+ チャネル膜タンパク質KcsAを観察した。マイカ基板に展開した固体支持膜に再構成したKcsAを高速AFM観察したところ、KcsA四量体の構造を明瞭に可視化でき、KcsAが膜中を回転・側方拡散する様子を観察することができた。しかしながら、本研究期間中に中空膜に再構成されたKcsAの観察を行うまでには至らなかった。また、脂質二重膜に再構成された膜タンパク質の側方拡散を抑制するためにナノアイランド構造を形成する予定であったが、FIBでこの構造を多数製作することは困難であった。現在、代表者の研究室で電子線リソグフィとエッチングによる微細加工設備が導入されたことから、今後、電子線リソグフィを使ってシリコン基板にナノアイランドの製作とKcsAの機能動態観察を進めていく。

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14件)

1. K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, "Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nat. Commun.* **5**, 3975 (2014). (査読有)
DOI:10.1038/ncomms4975.

2. A. Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, T. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, and M. Samejima, "Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose", *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4584-4592 (2014). (査読有) DOI:10.1021/ja4119994.
 3. T. Ando, T. Uchihashi, and S. Scheuring, "Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", *Chem. Rev.* **114**(6), 3120-3188 (2014). (査読有) DOI:10.1021/cr4003837.
 4. Y. Shibafuji, A. Nakamura, T. Uchihashi, N. Sugimoto, S. Fukuda, H. Watanabe, M. Samejima, T. Ando, H. Noji, A. Koivula, K. Igarashi, and R. Iino, "Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma Reesei* cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cell", *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065 (2014). (査読有) DOI:10.1074/jbc.M113.546085.
 5. 内橋貴之, 「高速原子間力顕微鏡による生体試料のダイナミクス観察」, 日本膜学会誌「膜」**39**(5), 322-328 (2014). (査読無)
 6. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノ動態撮影」, 日本物理学会誌 **69**(7), 459-464 (2014). (査読無)
 7. 杉本華幸, 五十嵐圭日子, 内橋貴之, 鈴木一史, 渡邊剛志, 「キチナーゼによる結晶性キチンのプロセッシング(連続的)な分解機構の解明」, 日本応用糖質科学会誌「応用糖質科学」**4**(2), 107-112 (2014). (査読無)
 8. 内橋貴之, 飯野亮太, 安藤敏夫, 野地博行, 「高速 AFM による F_1 -ATPase 分子回転の直接可視化」, 日本応用糖質科学会誌「生化学」**86**(2), 127-136 (2014). (査読無)
 9. M. Imamura, T. Uchihashi, T. Ando, A. Leifert, U. Simon, A. D. Malay and J. G. Heddle, "Probing structural dynamics of an artificial protein cage using high-speed atomic force microscopy", *Nano Lett.* **15**(2): 1331-1335 (2015). (査読有) DOI: 10.1021/nl5045617
 10. M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando and R. Yasuda "Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells" *Sci. Rep.* **5**, 8724 (7 pp) (2015). (査読有) DOI:10.1038/srep08724.
 11. K. Takeda, T. Uchihashi, H. Watanabe, T. Ishida, K. Igarashi, N. Nakamura, H. Ohno, "Real-time dynamic adsorption processes of cytochrome c on an electrode observed through electrochemical high-speed atomic force microscopy", *PLoS One* e0116685 (10 pages) (2015). (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0116685.
 12. S. Fukuda, T. Uchihashi, T. Ando, "Method of mechanical holding of cantilever chip for tip-scan high-speed atomic force microscopy", *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 063703 (2015). (査読有) DOI: 10.1063/1.4922381.
 13. W. Sriwimol, A. Aroonkesorn, S. Sakdee, C. Kanchanawarin, T. Uchihashi, T. Ando and C. Angsuthanasombat, "Potential pre-pore trimer formation by the *Bacillus thuringiensis* mosquito-specific toxin: Molecular insights into a critical prerequisite of membrane-bound monomers", *J. Biol. Chem.* **290**(34), 20793-20803 (2015). (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M114.627554.
 14. T. Uchihashi, H. Watanabe, S. Fukuda, M. Shibata and T. Ando, "Functional extension of high-speed atomic force microscopy", *Ultramicroscopy* **160**, 182-196 (2016). (査読有) DOI: 10.1016/j.ultramic.2015.10.017
- [学会発表] (計 10件)
1. T. Uchihashi, "Visualization of Single Molecule Dynamics at Work with High-Speed Atomic Force Microscopy", Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses, 21-25 April 2014, OIST Seaside House, Okinawa, Japan. (招待講演)
 2. 内橋貴之, 「高速 AFM による生体試料のダイナミクス観察」, 日本膜学会第 36 回年会 境界領域シンポジウム「膜解析の最前線～生体膜・膜タンパク質から模擬膜, ソフトマターまで～」, 2014 年 5 月 12-13 日, 早稲田大学, 東京. (招待講演)
 3. T. Uchihashi and T. Ando, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force", Agilent Nanomeasure 2014, 16-17 September 2014, The National Center for NanoScience & Technology, Beijing, China. (招待講演)

4. T. Uchihashi and T. Ando, "Single-molecule imaging of proteins at work with high-speed atomic force microscopy", 16th International Conference on Retinal Proteins, 5-10 October 2014, Nagahama Royal Hotel, Shiga, Japan. (招待講演)
5. 内橋貴之, 「高速原子間力顕微鏡の開発とバイオ応用」, 新世代研究所水和ナノ構造・界面ナノ科学合同研究会「固液界面の水和ナノ構造と生体高分子ダイナミクス」, 2015年1月24-25日, 伊豆長岡温泉 天坊, 静岡. (招待講演)
6. 内橋貴之, 「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質のダイナミクスと物性計測」, 第9回NIBBバイオイメージングフォーラム「物理特性のイメージング」, 2015年1月27日, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知. (招待講演)
7. T. Uchihashi, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy", The 7th Biennial Australian Colloid & Interface Symposium, 1-5 February 2015, Hotel Grand Chancellor, Hobart, Tasmania, Australia. (キーノート講演)
8. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscope for imaging of biomolecular dynamics at solid surface", 10th Annual International Electromaterials Science Symposium, 11-13 February 2015, ARC Centre of Excellence for Electromaterials Science, Wollongong, Australia. (招待講演)
9. 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡で可視化する分子動態と細胞運動」, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015年5月13-15日, 京都国際会議場, 京都. (招待講演)
10. T. Uchihashi, "Direct Visualization of Single Molecule Dynamics at Work with High-Speed Atomic Force Microscopy", The 15th KIAS Conference on Protein Structure and Function, 17-19 September 2015, Korean Institute for Advanced Study, Seoul, Korea. (招待講演)

〔図書〕(計 3件)

1. T. Uchihashi, N. Kodera, T. Ando, "Development of High-speed AFM and Its Biological Applications" Chapter 8: pp. 143-176 in Atomic Force Microscopy in Nanobiology (Kunio Takeyasu Ed.) 437 pp. Pan Stanford Publishing, Singapore (2014). ISBN: 978-981-4411-59-2 (eBook).

2. T. Uchihashi, Noriyuki Kodera, and Toshio Ando, "High-speed Atomic Force Microscopy", Chapter 22, pp.481-518 in Noncontact Atomic Force Microscopy Vol.3 (Seizo Morita, Franz J. Giessibl, Ernst Meyer, Roland Wiesendanger, Eds) 527 pp. Springer (2015). ISBN: 978-3-319-15587-6.

3. 内橋貴之, 「光と生命の事典」: 第5章 「光による生命現象の計測」177節 高速原子間力顕微鏡, 真嶋哲郎, 七田芳則, 飯野盛利, 藤堂剛 (編), 朝倉書店, 2016年02月25日 ISBN: 978-4-254-17161-7.

〔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

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
内橋 貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)
金沢大学・数物科学系・教授
研究者番号: 30326300
 - (2) 研究分担者
飯野 亮太 (IINO, Ryota)
自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授
研究者番号: 70403003

- (3) 連携研究者
()
研究者番号: