

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18517

研究課題名(和文) 高速原子間力顕微鏡による膜輸送タンパク質の動作機構の解明

研究課題名(英文) Membrane protein dynamics studied by high speed atomic force microscopy

研究代表者

山下 隼人(Hayato, Yamashita)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：10595440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高速AFMで膜輸送タンパク質1分子の構造ダイナミクスを詳細に可視化するためのAFM技術開発と、分子機能過程を明らかにするためのイメージングを行った。技術開発ではスキャナーのXY走査における板バネ構造の改良による走査精度の向上と広域・狭域の走査範囲を分担した新しい走査機構の開発に成功した。また電位依存性プロトンチャンネル(VSOP)を脂質二重膜へ再構成し、上記の技術を用いて1分子イメージングを行った結果、10nm程の球状分子と20nm程のリング状構造の分子の観察に成功し、リング状構造が2つに分離する過程も観察された。本研究により脂質膜中でのVSOPの新たな構造学的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We developed high speed atomic force microscopy (HS-AFM) technique for visualizing single molecular membrane protein in detail and observed dynamic functioning process of membrane protein molecules in planar lipid bilayers. We improved the strength of flexure structure in AFM scanner and achieved higher scan accuracy. We also succeeded to develop new scan mechanics divided wide and narrow area. Using these technique, we observed proton channel, voltage sensor only protein (VSOP), reconstituted to lipid bilayers. As the results, HS-AFM visualized that globular molecules of 10nm in diameter and ring like structural molecules of 20nm in diameter. These molecular structures are also observed for mutant S188C. Furthermore, HS-AFM movies captured N-term antibody binding process and the dissociation process of the ring like structural molecule. These information will provide new insights for the structural study of VSOP.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 1分子イメージング 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞外からのシグナル伝達、細胞内外の分子輸送、細胞内の代謝、細胞同士の接着・固定といった細胞機能の多くを担っており、実際ゲノムが指令するタンパク質の約3割が膜タンパク質であることから、生物学的に非常に重要なタンパク質である。また、現存の治療薬の約半数が膜タンパク質をターゲットとしていることから、膜タンパク質は医学的にも非常に重要なタンパク質である。そのため、これまで生化学的分析手法、蛍光顕微鏡やX線回折、NMRなどの様々な分析・計測技術を用いて研究が行われ、個々のターゲット膜タンパク質の多分子の平均としての生理作用や原子レベルの構造情報が得られてきた。

しかし、これらの技術では生理溶液中において機能している生体分子そのものの動態を直接観察することができないため、ターゲットの分子レベルでの構造変化や薬剤に対する作用などは明らかにされなかった。

高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は生理溶液環境下にあるタンパク質分子の機能動態を可視化できる顕微鏡装置として、これまでモータータンパク質などの可溶性タンパク質試料の1分子レベルでの機能動態の可視化に成功してきた。一方、膜タンパク質は二次元膜環境という限られた領域で機能し、その構造変化は微小なものが多く、また、機能過程の観察にはイオン濃度勾配や電位差などの細胞内外環境の構築が求められることから、1分子レベルでの構造ダイナミクスの観察は困難であった。

### 2. 研究の目的

生体分子の動態をリアルタイムで直接観察できる高速原子間力顕微鏡を用いて、膜タンパク質の構造変化や多量体形成過程を1分子レベルで可視化し、その動作機構を明らかにする。膜輸送タンパク質には、チャンネルやトランスポーターなど、疾患に関わり創薬のターゲットとなるものが数多く存在するが、一方でその分子構造や動作機構が明らかにされたものは限られている。

本研究では、このような膜輸送タンパク質の生理溶液中における分子構造を詳細に可視化するため、高時空間分解能で撮影可能な高速 AFM 技術を構築する。また、基板上で膜タンパク質の機能過程を観察するための AFM 観察環境の構築を行う。開発した技術をもとに、膜輸送タンパク質を1分子レベルで観察を行い、動作過程を明らかにする。

### 3. 研究の方法

生理溶液中で膜タンパク質の分子構造を詳細に可視化するための AFM 技術の開発として、高速高精度に走査可能なスキャナーの開発を行った。現有のビデオフレーム取得可能な高速 AFM のスキャナーは図1で示すように X, Y 方向に駆動する圧電素子(ピエゾ)で

板バネ構造を押す事により走査を行っている。AFM の空間分解能はスキャナーの位置精度と深く関わっており、板バネが弱ければ(柔らかければ)各方向の伸び係数が大きく、その分走査ノイズが大きくなり、分解能が低下する。そこで、ヘテロダイン方式レーザー変位計を用いて、XY 方向の駆動特性の評価を行い、より高分解能を実現するための板バネ構造の設計と強度の条件検討を行った。

また、膜タンパク質の分子イメージングでは、単離精製した電位依存性プロトンチャネル(VSOP)を人工脂質膜へ再構成を行い、AFM 観察を行った。脂質の種類、タンパク質・脂質の比率、再構成時の温度などの条件を検討することにより、脂質膜中での VSOP の最適な分子状態・局在の探索を行った。

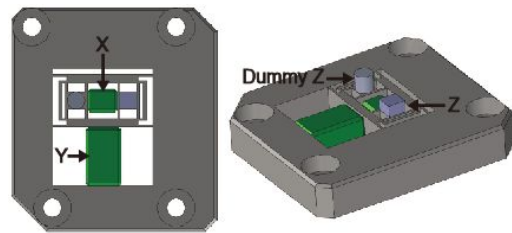


図1: 板バネ構造を利用した高速 AFM スキャナーの模式図

### 4. 研究成果

#### 高速 AFM 技術の開発

高速高精度に走査可能なスキャナーを実現するため、XおよびY方向に圧電素子で駆動する板バネ機構の厚さを0.4mm、0.6mm、1.0mmにした構造のスキャナーを作成し、X方向の駆動特性を評価した結果、71kHz、82kHz、103kHzと共振周波数が向上することが分かった。このスキャナーの走査性能の評価を行うため、HOPG(グラファイト)のSTM観察を行った所、炭素原子が蜂の巣状に配列した原子構造を数百ミリ秒/frameの撮像速度で撮影することに成功した(図2)。

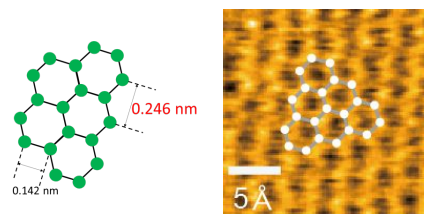


図2: (左)HOPGの炭素原子の配置。(右)HOPGのSTM像(2nm×2nm, 1.0sec/frame)

また、走査範囲を分担した新しい構造のスキャナーを考案した。広域走査は伸びの大きな駆動機構にし、一方で狭域は伸びが小さく高周波駆動可能な機構を採用する事により、ターゲットとする膜輸送タンパク質1分子を従来よりも高解像度かつ高速で撮影可能なスキャナーの開発を行った(特許出願)。さら

に、高速 AFM 装置の構築にあたって、高い SN 比でカンチレバーの振動振幅を検出可能なフーリエ振幅計測法の導入を行った。

#### 膜タンパク質分子観察環境の構築

生体分子の機能過程の観察にはその環境が重要となる。特に温度は生体分子の反応速度や相互作用に重要な要素である事から、観察環境の温度制御機構の開発に取り組んだ。透明導電膜付ガラスに電極を取り付け、絶縁断熱ホルダーで囲った高速 AFM 溶液チャンバーを作成した。これを用いて、高速 AFM で 2 種混合脂質膜を観察中に電極間に電圧を印加した結果、片方の脂質の相転移温度付近で脂質ドメイン構造が融解する過程の観察に成功し、サンプルの温度を正確に制御可能である事を示した。

また従来の AFM による膜タンパク質観察の多くは、固体基板に展開した支持膜中に再構成された分子に対して行われてきた。しかし、膜タンパク質が機能するには細胞内外のイオン濃度勾配や電位差が必要となることから、高速 AFM で膜タンパク質の機能過程を可視化するために中空平面膜環境の構築に取り組んだ。集束イオンビーム(FIB)を用いて AFM ガラス基板表面に数百ナノメートル程度の穴(ナノウェル)を作成し(図 3)、脂質二重膜を展開した結果、ナノウェル表面が膜で覆われた、支持基板のない中空膜環境を構築することに成功した。

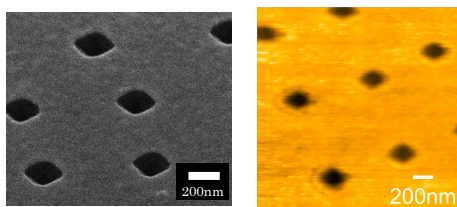


図 3: AFM ガラス基板に作成したナノウェルの SEM 像(左)と AFM 像(右)

#### 再構成膜タンパク質の分子イメージング

膜タンパク質の高速 AFM 観察として、電位依存性プロトンチャンネル(VSOP)の脂質膜への再構成と 1 分子イメージングを行った。VSOP はイオンポア部分を欠損した膜電位センサーのみからなる 4 回膜貫通型のイオンチャンネルであり、電位に依存してプロトンを透過する。電気生理学的手法により、イオンチャンネルとしての機能が詳しく調べられており、また最近、静止状態における X 線結晶構造も明らかにされた。しかしながら、分子機能過程におけるダイナミックな挙動の詳細はまだ明らかにされていない。本研究ではまず、人工脂質膜に単離精製 VSOP を再構成した後、高速 AFM により、脂質膜中の分子のリアルタイム観察を行った。

その結果、直径 10nm 程度の球状分子と直径 20nm 程度のリング状構造の分子が脂質二重膜中で観察された。同様の構造形態は変異

体 S188C でも観察され、さらに野生型をイメージング中に N 末抗体を投与した結果、脂質膜中の分子に抗体分子が結合する過程が観察された。

また、直径約 20nm のリング構造の分子を観察中に 2 つに分離する過程が撮影された。VSOP は 2 量体を形成し、協調してチャンネル開閉を制御していると考えられてきたが、構造的知見は限られていた。本研究で得られた結果は VSOP が機能ユニットとして、脂質膜中で 2 量体を形成している事を示唆していると考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

(招待講演)

1. 山下隼人、「高速原子間力顕微鏡によるナノメートル世界の動的観察」、平成 28 年度「物質・材料科学研究推進機構」講演会、2017 年 1 月 26 日、大阪大学(大阪府・豊中市)

(国際学会)

2. T.Azuma, Z.Oestreicher, H.Yamashita, T.Uchihashi, T.Ando, Y.Fukumori, “A new look at the nanostructure of the outer surface of living Proteobacteria using the high-speed atomic force microscope”, 4<sup>th</sup> Kanazawa Bio-AFM Workshop 2016, 2016/10/3~6, KKR ホテル金沢(石川県・金沢市)(口頭発表)

3. D.Katsube, H.Yamashita, S.Abo, F.Wakaya, M.Abe, “Development of Combined System of Pulsed Laser Deposition and Non-Contact Atomic Force Microscopy and High Resolution Imaging of Anatase-TiO<sub>2</sub>(001) Reconstructed Surface”, International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2016), 2016/11/8-11, ANA Crown Plaza Kyoto(京都府・京都市)(Poster)

4. D.Katsube, H.Yamashita, S.Abo, F.Wakaya, M.Abe, “Development of Combined System of Pulsed Laser Deposition and Non-Contact Atomic Force Microscopy and Imaging of Anatase-TiO<sub>2</sub>(001) (1×4) Reconstructed Surface”, 20<sup>th</sup> International Vacuum Congress (IVC-20), 2016/8/22-26, BEXCO(BUSAN, KOREA)(Poster)

(国内学会)

5. 山下隼人、川鍋陽、岡村康司、阿部真之、”Single molecular observation of voltage-gated proton channels by high speed AFM”，第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日～12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)(ポスター)
6. H. Yamashita, A. Kawanabe, Y. Okamura and M. Abe, “Direct observation of voltage-gated proton channels by high speed AFM”，第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日～11月27日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)(ポスター)
7. 加藤恭介、山下隼人、久富修、阿部真之、「高速原子間力顕微鏡による光転写制御モジュール Photozipper の1分子動態観察」、日本生化学会近畿支部例会、2017年5月27日、大阪大学(大阪府・豊中市)(口頭発表)
8. 勝部大樹、山下隼人、阿保智、若家富士男、阿部真之、「アナターゼ型 TiO<sub>2</sub>(001)表面の非接触原子間力顕微鏡測定」、日本金属学会2016年秋季(第159回)講演会、2016年9月21日～23日、大阪大学(大阪府・豊中市)(口頭発表)
9. 勝部大樹、山下隼人、阿保智、若家富士男、阿部真之、「アナターゼ型 TiO<sub>2</sub>(001)表面のフォースカーブ測定」、第77回応用物理学会秋季学術講演会、2016年9月13日～16日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)(ポスター発表)
10. 勝部大樹、山下隼人、阿保智、若家富士男、阿部真之、「パルスレーザー堆積/非接触原子間力顕微鏡複合装置の開発とアナターゼ型 TiO<sub>2</sub>(001)表面の高分解能測定」、第63回応用物理学会春季学術講演会、2016年3月19日～22日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都・目黒区)(口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡  
 発明者：山下隼人、阿部真之  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特願 2017-002183  
 出願年月日：2017年1月10日  
 国内外の別：国内

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

1. 大阪大学大学院基礎工学研究科附属極限科学センター

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

2. 大阪大学研究者総覧

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/search?m=home&l=ja>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 隼人 (YAMASHITA, Hayato)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：10595440

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )