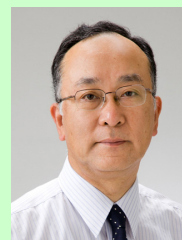


極めて柔らかい膜環境にあるタンパク質分子のナノ動態 イメージングの実現

Realization of nano-dynamics imaging of protein molecules in
extremely soft membrane environments

課題番号：17H06121

安藤 敏夫（ANDO, TOSHIO）金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任教授



研究の概要（4行以内）

現在の高速 AFM では観察できない極めて柔らかい膜環境にあるタンパク質分子などの観察を可能にするための技術開発とその実証研究を行う。具体的には、膜表裏の間に非対称な環境を設定できるアッセイ系の開発、非接触イメージング可能な走査型イオン伝導顕微鏡の高速化と高解像化を実現する技術開発、及び、探針-試料間の接触力を更に低減した高速 AFM を開発する。

研究分野：生物物理学・ナノバイオロジー

キーワード：膜蛋白質・高速 AFM・走査型イオン伝導顕微鏡・バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

代表者が開発した高速 AFM は蛋白質分子の構造機能動態を直接観察することを初めて可能にし、生命科学研究に欠かせない技術として世界に普及しつつある。また、継続的に進めた技術開発により、他の技術との複合化など高速 AFM の機能拡張が進んだ。しかしそれでもなお、現在の高速 AFM では観察できない試料系や現象が多く存在する。特に極めて柔らかい膜に存在する蛋白質分子の動的プロセスを生理的な環境下で観察できない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この限界を破る技術を開発し、細胞や分離した細胞内小器官の表面、或いは、膜を一部取り去ったデルーフ細胞の内部などで起こる動的分子プロセスのその場観察や、生理的条件では存在する膜表裏間の非対称な環境（濃度、電位差など）の下で起こる精製した膜蛋白質分子の動態観察を実現することにある。

3. 研究の方法

上記目的達成のために、以下の三つの課題を設定した。(1)膜表裏の間に非対称な環境を設定できるアッセイ系の開発とそれによる精製した膜蛋白質分子の高速 AFM による機能動態観察、(2)非接触イメージング可能な走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM) の高速化と高解像化、及び、それらの両立、(3)探針-試料間接触力を更に低減した低侵襲性に優れた更に速い高速 AFM の開発。

4. これまでの成果

(1) 膜表裏の間に非対称な環境をもつアッセイ系の実現：いくつかの異なる手法を検討した。(i) Biotin を強く結合する Tamavidin 2-LPI (TV) の二次元結晶をマイカ上に直接形成する方法を見出した。その結晶に直径 20-30nm 程度の孔を多く形成する方法も見出した。この孔の空いた二次元結晶の上に Biotin 脂質を含むリポソームを載せると、脂質二重層膜が形成された。これにより、非対称な溶液環境を膜の上下に作ることができ、イメージング中に膜は 0.2 nm 程度しか変形しない (図 1a, b)。(ii) ナノ開口をもつピペット先端に探針を近づけ、開口部を高速 AFM 観察することに成功した (図 1c, d)。パッチクランプ法のように開口部に膜を張ることが可能のため、膜表裏の間にイオンなどの濃度勾配ばかりでなく、電位差を持たすことが容易にできる。(iii) ナノ粒子を堆積させた凹凸のある基板に膜とともに膜蛋白質を載せることにも成功した。その結果、ABC トランスポーターである MsbA の膜貫通側の面を高い解像度でイメージングできた (図 1e)。

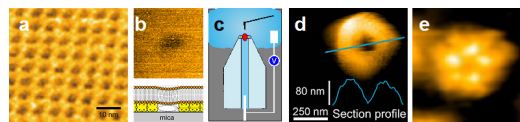


図 1. 膜表裏の間に非対称環境を有するアッセイ系の開発

(2) 非接触イメージング可能な SICM の高速化と高解像化、及び、その両立：SICM では電解質を充填したナノピペットをプローブと

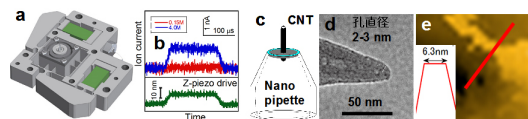


図 2. 高速・高解像 SICM の開発

して利用する。ピペット内外に電位差をかけ、開口部を流れるイオン電流を計測する。試料表面が開口部に近づくと、イオン電流が減少するため、試料表面のトポグラフィーを観察できる。だが、ピペットのインピーダンスは大きく、電気容量とカップルしてイオン電流計測の応答は遅い。そこで、高濃度の KCl 溶液をピペットに充填しインピーダンスを下げるとともに、電気容量の最小化や I/V アンプのノイズの低減化、高速スキャナーにより、従来より 100 倍以上高速な SICM を実現することに成功した (図 2a, b)。一方、SICM の解像度はピペットの開口径で決まるため、開口の極めて小さいピペットの作成法をいくつか検討した (図 2c-e)。ナノピペットの先端に膜を張り、そこに短いカーボンナノチューブ (CNT) を挿入し、イオン電流が増大することを確認した。だが、成功確率は低く日常的に利用する技術には未だなっていない。レーザープレーのパラメータを種々検討した結果、壁厚が薄く開口直径 2-6nm のピペットを高い確率で作成することに成功した。PDMS 薄膜の観察で幅 6.3nm の領域を明瞭に観察できたことから、3nm 程度の分解能を実現したと思われる。残る課題は高速性と高解像度の両立であるが、開口径を小さくするとインピーダンスが増大するため、従来の計測法ではこの両立は難しい。第二の計測法 (未発表のため詳細は省く) を検討した結果、この方法でもイオン電流計測と同様のイメージングができることを確認した。

(3) 高速 AFM の探針-試料間接触力の更なる低減化：いくつかの手法を検討した。未発表のため詳細は省くが、X 走査を工夫することにより低減化に成功し、且つ、従来よりも高速に (毎秒 20 フレーム) 脆弱なバイオ試料を壊さずに長時間イメージングできることを確認した。また、フィードバック制御の帯域を向上させる方法によっても、力の低減化と更なる高速化を実現した。

5. 今後の計画

上記の三課題の研究は目標に向け順調に進捗している。第一の課題で残された問題は手法のポリッシュアップと実際の膜蛋白質の機能動態イメージングである。おそらく、蛋白質を輸送する膜蛋白質系の観察が最もインパクトが有りそうであるため、その専門の研究者と共同研究を進めたい。第二の課題では高速性と高解像度の両立が残されている。これも現在進めている新規測定法のポリッシュアップで実現するものと見込んでいる。

それにより、デルーフ細胞の内部などで起こる動的プロセスのその場観察やトランススケールイメージングを実現したい。第三の課題では、どこまで飛躍的な高速化が低侵襲性ととも実現できるか楽しみにしている。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. N. Kodera, ---, T. Ando (18 名中 18 番目), Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy, *Nature Nanotechnol.* (accepted).
2. Fujioka, ---, T. Ando (11 名中 5 番目), ---, N. N. Noda, Phase separation organizes the site of autophagosome formation, *Nature* 678, 301-305 (2020).
3. S. Watanabe, S. Kitazawa, L. Sun, N. Kodera, T. Ando, Development of high-speed ion conductance microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 90, 123704 (2019).
4. L. Sun, K. Shigyou, T. Ando, S. Watanabe, Thermally driven approach to fill sub-10-nm pipettes with batch production, *Anal. Chem.* 91, 14080-14084 (2019).
5. M. Owa, T. Uchihashi, H. Yanagisawa, T. Yamano, H. Iguchi, H. Fukuzawa, K. Wakabayashi, T. Ando, M. Kikkawa, Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella, *Nature Commun.* 10, article no. 1143 (2019).
6. T. Mori, S. Sugiyama, M. Byrne, C. H. Johnson, T. Uchihashi, T. Ando, Revealing circadian mechanisms of integration and resilience by visualizing clock proteins working in real time, *Nature Commun.* 9, article no. 3245 (2018).
7. T. Uchihashi, Y. Watanabe, Y. Nakazaki, T. Yamasaki, H. Watanabe, T. Maruno, K. Ishii, S. Uchiyama, C. Song, K. Murata, R. Iino, T. Ando, Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function, *Nature Commun.* 9, article no. 2147 (2018).
8. D. Noshiro, T. Ando, Substrate protein dependence of GroEL-GroES interaction cycle revealed by high-speed AFM imaging, *Roy. Soc. Phil. Transac. B* 373, 20170180 (2018).
9. T. Haruyama, T. Uchihashi, Y. Yamada, N. Kodera, T. Ando, H. Konno, Negatively charged lipids are essential for functional and structural switch of human 2-Cys peroxiredoxin II, *J. Mol. Biol.* 430, 602-610 (2018).

7. ホームページ等

1. 研究室ホームページ

http://biophys.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_J.htm

2. 研究所ホームページ

<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/achievements/achievements-9789/>